

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

DIVISIÓN DE EDUCACIÓN

PROGRAMA DE POSGRADO

Uso de *Tithonia diversifolia* como forraje alternativo para la reducción de emisiones de óxido nitroso en excretas de vacas

Tesis sometida a consideración de la División de Educación y el Programa de Posgrado como requisito para optar al grado de Magister Scientiae en Agroforestería y Agricultura Sostenible

Pablo Adán Chacón Góngora

Turrialba, Costa Rica

2018

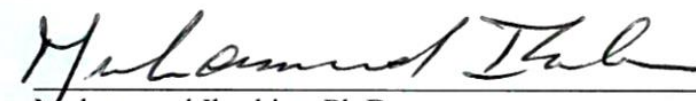
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por la División de Educación y el Programa de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del estudiante, como requisito parcial para optar por el grado de

MAGISTER SCIENTIAE EN AGROFORESTERIA Y AGRICULTURA SOSTENIBLE

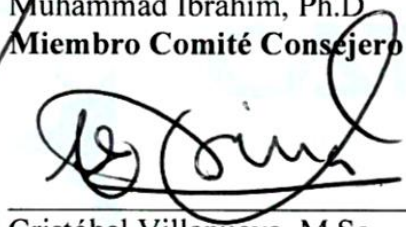
FIRMANTES:



Diego Tobar, M.Sc.
Director de tesis



Muhammad Ibrahim, Ph.D
Miembro Comité Consejero

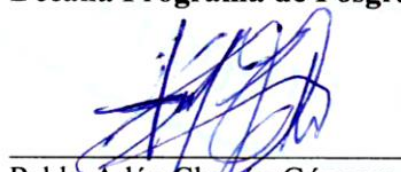


Cristóbal Villanueva, M.Sc.
Miembro Comité Consejero

Sergio Abarca, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



Isabel A. Gutiérrez-Montes, Ph.D.
Decana Programa de Posgrado



Pablo Adán Chacón Góngora
Candidato

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE CUADROS	VI
DEDICATORIA.....	VII
AGRADECIMIENTOS	VIII
ACRONIMOS	IX
RESUMEN	X
CAPÍTULO I	1
1. Introducción	1
2. Objetivos.....	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. Revisión de literatura.....	4
3.1 Ciclo del nitrógeno y su participación en la ganadería	4
3.2 Nitrificación.....	6
3.3 Desnitrificación.....	8
3.4 Emisiones de óxido nitroso en sistemas de pastoreo (estiércol y orina)	8
3.5 El estiércol en ganadería	9
3.6 Prácticas recomendadas para la reducción de emisiones de óxido nitroso.....	10
3.7 Metabolitos secundarios en las plantas y sus efectos en el uso del N.....	11
3.8 Efecto de los compuestos secundarios ganadería	14
3.9 Comportamiento de la producción por el uso de taninos en las dietas	15
3.10 <i>Tithonia diversifolia</i> como estrategia para mitigar las emisiones de oxido nitroso	15
3.11 Bibliografía.....	17
CAPÍTULO II	31
4. Artículo 1. Uso del botón de oro (<i>Tithonia diversifolia</i>) como suplemento alimenticio para la reducción del nitrógeno excretado en la orina de vacas lecheras en Turrialba, Cartago, Costa Rica...	31
4.1 Resumen	31
4.1 Abstrac.....	32
4.2 Introducción	33
4.3 Materiales y métodos.....	34
4.4 Resultados y discusión	37
4.4.1 Consumo de materia seca	37
4.4.2 Producción de leche y su contenido de nitrógeno ureico (MUN)	39
4.4.3 Excreción de nitrógeno en heces y orina.....	41
4.5 Conclusiones.....	43
4.6 Recomendaciones.....	44

4.1	Bibliografía.....	45
5.	Artículo 2. Estimación de los flujos de óxido nitroso en heces y orina de vacas alimentadas con botón de oro (<i>Tithonia diversifolia</i>) en pasturas del trópico bajo de Costa Rica.....	50
5.1	Resumen	50
5.1	Abstrac.....	51
5.2	Introducción	52
5.3	Materiales y métodos.....	54
5.4	Análisis de los datos	57
5.5	Resultados y discusión	58
5.5.1	Variables ambientales y humedad del suelo	58
5.5.2	Flujos de óxido nitroso en parches de orina.	61
5.5.3	Flujos de óxido nitroso en heces.	63
5.6	Conclusiones.....	68
5.7	Recomendaciones.....	69
5.8	Bibliografía.....	70
6.	Anexos.....	75
	Anexo 1. Formato para toma de datos de campo en experimento de dietas suplementadas con <i>Tithonia diversifolia</i>	75
	Anexo 2. Formato de campo para toma de datos en muestro de oxido nitroso	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseño experimental de ensayo con parches de heces y orina para estimar los flujos de óxido nitroso en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica	56
Figura 2. Distribución de la temperatura y precipitación a lo largo del periodo de muestro de óxido nitroso, finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica	59
Figura 3. Comparación de los flujos de óxido nitroso de heces y orina ($p < 0,05$) provenientes del ensayo realizado en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	60
Figura 4. Flujos de óxido nitroso en parches de orina de los grupos 1 y 2 a lo largo de 113 días después de la aplicación de los tratamientos correspondientes al ensayo realizado en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	61
Figura 5. Flujos de óxido nitroso en parcelas tratadas con heces (T1h, T2h y T3h), comparados con los flujos del tratamiento control en un experimento realizado en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	63
Figura 6. Curvas de las emisiones acumuladas para los tratamientos de orina en el experimento realizado para estimar los flujos de óxido nitroso en vacas alimentadas con <i>Tithonia diversifolia</i> en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica	65
Figura 7. Curvas de las emisiones acumuladas para los tratamientos de heces en el experimento realizado para estimar los flujos de óxido nitroso en vacas alimentadas con <i>Tithonia diversifolia</i> en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica	65
Figura 8. Flujos acumulados en los tratamientos con heces y orina durante 12 días después de la aplicación en el experimento realizado para estimar los flujos de óxido nitroso en vacas alimentadas con <i>Tithonia diversifolia</i> en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características de las vacas seleccionadas para el ensayo en la finca experiemetal del CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	34
Cuadro 2. Formulación de las dietas (tratamientos) según el nivel de <i>T. diversifolia</i> del ensayo llevado a cabo en la finca experiemetal del CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	35
Cuadro 3. Características de <i>T. diversifolia</i> a los 65 días después de la poda de un lote de la plantación establecida en el CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	36
Cuadro 4. Características de <i>Tithonia diversifolia</i> a los 65 días	36
Cuadro 5. Consumo diario de materia seca (kg MS 100kg ⁻¹ de peso vivo) y N (g 100 kg ⁻¹ de peso vivo) en vacas alimentadas con tres dietas experimentales en la finca del CATIE, Turrialba, Costa Rica	38
Cuadro 6. Producción media de leche y nitrógeno ureico (MUN) en leche en vacas alimentadas con tres dietas-tratamientos en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica	40
Cuadro 7. Producción y excreción de N en heces de vacas alimentadas con tres dietas-tratamientos en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica	41
Cuadro 8. Producción de orina (l día ⁻¹) y N en orina de las vacas alimentadas con tres dietas-tratamientos en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	42
Cuadro 9. Ingredientes en la alimentación de las vacas utilizadas para la producción de excretas en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica	54
Cuadro 10. Descripción de los tratamientos aplicados al suelo durante un ensayo para estimar los flujos de óxido nitroso en heces y orina en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica	55

DEDICATORIA

Con toda la esperanza que este trabajo contribuya al desarrollo de una producción sostenible y consciente, lo dedico a todas las personas encontradas durante mi paso por CATIE quienes me han dejado grandes enseñanzas y me hicieron pensar que es posible un desarrollo responsable.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al fondo Wallace y al CATIE, por otorgarme la beca parcial necesaria para llevar a cabo mis estudios de maestría, así como a mis padres quienes creyendo en mis aspiraciones siempre estuvieron para apoyarme.

A las pasantes Louis y Camille, por involucrarse incondicionalmente en todo el trabajo detrás del presente estudio.

Agradezco a mi director de tesis y mis profesores consejeros, por su paciencia y acompañamiento en todo el proceso de aprendizaje.

A mis compañeros de promoción por todo el apoyo durante esta experiencia de vida como estudiante de CATIE.

Un agradecimiento especial a los vaqueros Eliezer y Alex, encargados del ordeño en la lechería del CATIE, por su gran ayuda durante mi fase de campo, así como a Frank López, quien me brindó todo su apoyo en el laboratorio de GAMMA-CATIE.

ACRONIMOS

IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
CO₂	Dióxido de carbono
CH₄	Metano
GEI	Gases de efecto invernadero
Mt	Megatoneladas
eq	Equivalente
N	Nitrógeno
C	Carbono
CATIE	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
TC	Taninos condensados
PC	Proteína cruda
MO	Materia orgánica
N₂O	Óxido nitroso
VAMPP	Veterinary Automated Management and Production Control Program
BO	Boton de oro (nombre común de <i>Tithonia diversifolia</i>)

RESUMEN

La actividad ganadera genera un ingreso grande de nitrógeno al suelo en forma de excretas (heces y orina), lo que genera pérdidas de este elemento causando daños ambientales como emisiones de óxido nitroso (N_2O), principalmente en la orina, la cual contiene N susceptible a la rápida degradación. Se ha visto que forrajes ricos en metabolitos secundarios podrían influir en la ruta de N, reduciendo su excreción vía urinaria. En este sentido, se ha reportado que *Tithonia diversifolia* es una planta bien adaptada a la región con buenas cualidades forrajeras, que junto a su contenido de metabolitos secundarios muestra el potencial de ser un forraje altamente nutritivo pero que también protege los nutrientes de la excesiva degradación por acción de los microorganismos en el rumen.

El presente trabajo evaluó el potencial de *T. diversifolia* en la reducción de emisiones de óxido nitroso, con el apoyo de dos experimentos. En el primero se midió el cambio en el porcentaje de N excretado en heces y orina por efecto de la suplementación con *T. diversifolia*, en un sistema semi-estabulado donde se probaron dietas con diferentes niveles (0%, 6% y 12% de materia seca en la dieta), a un grupo de 9 vacas bajo diseño experimental de cuadrado latino 3X3. Las vacas fueron alimentadas en los dos momentos de ordeño del día, con un sistema de corte y acarreo. Cada periodo contó con 9 días de adaptación y 4 experimentales para sumar un total de 13 días. Después de evaluar los datos recolectados en los tres periodos, se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de N excretado para heces y orina ($p < 0,05$), con una tendencia a reducir el porcentaje de N excretado en la orina cuando se utilizó *T. diversifolia* en la dieta, el nitrógeno ureico en leche fue significativamente menor cuando las vacas se alimentaron con más cantidad de *T. diversifolia* ($p < 0,05$), no se encontraron diferencias significativas en la producción de leche. Los resultados obtenidos ponen en evidencia el potencial de *T. diversifolia* como un forraje complementario en la dieta de la ganadería tropical.

Un segundo experimento comparó los flujos de óxido nitroso de excretas correspondientes a diferentes niveles de N. Se aplicaron 7 tratamientos al suelo, con 4 réplicas en un diseño de bloques completos al azar. Tres tratamientos de heces (T1h, T2h, T3h), correspondientes a vacas suplementadas con tres gradientes de *T. diversifolia* (0%, 6% y 12%) y tres tratamientos de orina (T1o, T2o, T3o), correspondientes a las mismas vacas con tres niveles (0%, 6% y 12%) de *T. diversifolia* en la dieta. Después de 3 meses de muestreo se obtuvo una diferencia significativa en los flujos de óxido nitroso entre heces y orina ($p < 0,05$). Sin embargo no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos de orina (T1o, T2o, T3o, $p > 0,05$), tampoco se encontró diferencia en los flujos de óxido nitroso entre los tratamientos de heces ($p > 0,05$). Es probable que la cantidad de N reducido en excretas debe ser mayor para encontrar un efecto en las emisiones de N_2O ; sin embargo, no se descarta el potencial del forraje para bajar las concentraciones de N en la orina. Por otro lado, los resultados dejan evidencia del potencial de las heces en la fertilización de las pasturas comparado con la orina, debido a la capacidad de liberar el N lentamente.

Palabras clave: óxido nitroso, metabolitos secundarios, orina y heces.

Abstrac

In livestock there are large amounts of nitrogen to the soil in the form of excreta (feces and urine), which causes losses of the element causing environmental damage such as nitrous oxide emissions (N_2O), mainly in urine which contains N susceptible to rapid degradation. It has been seen that forages rich in secondary metabolites could influence the route of excretion of N, reducing the loss via urinary. In this sense, it has been reported that *Tithonia diversifolia* is a plant well adapted to the region with good forage qualities, which together with its content of secondary metabolites shows the power of being a highly nutritious forage but also protects the nutrients from excessive degradation by the action of microorganisms in the rumen.

The present work evaluated the potential of *T. diversifolia* in the reduction of nitrous oxide emissions, with the support of two experiments. In the first, the change in the percentage of N excreted in faeces and urine was measured by the effect of supplementation with *T. diversifolia*, in a semi-stable system where diets with different levels of *T. diversifolia* were tested (0%, 6% and 12% of dry matter in the diet), to a group of 9 cows under the experimental design of a 3X3 Latin square. The cows were fed at the 2 milking moments of the day, with a cutting and hauling system, each period had 9 days of adaptation and 4 experimental days to add a total of 13 days. After evaluating the data collected in the three periods, significant differences were found in the percentage of N excreted for feces and urine ($p < 0.05$), with a tendency to reduce the percentage of N excreted in the urine when *Tithonia diversifolia* was used in The diet, the urea nitrogen in milk was significantly lower when the cows were fed with more amount of *T. diversifolia* ($p < 0.05$), no significant differences were found in milk production. The results obtained show the potential of *T. diversifolia* as a complementary forage in the diet of tropical livestock.

A second experiment compared the nitrous oxide flows of excreta corresponding to different levels of N. Seven treatments were applied to the soil, with 4 replicates in a randomized complete block design. Three stool treatments (T1h, T2h, T3h), corresponding to cows supplemented with three gradients of *T. diversifolia* (0%, 6% and 12%) and three urine treatments (T1o, T2o, T3o), corresponding to them cows with three levels (0%, 6% and 12%) of *T. diversifolia* in the diet. After 3 months of sampling a significant difference was obtained in nitrous oxide flows between faeces and urine ($p < 0.05$). However, no significant difference was found between treatments (T1o, T2o, T3o, $p > 0.05$), nor was there difference in nitrous oxide flows between stool treatments ($p > 0.05$). It is likely that the amount of N reduced in excreta should be higher to find an effect on N_2O emissions, however the potential of alternative forages to lower N concentrations in the urine is not ruled out. On the other hand, the results leave evidence of the feces potential in pasture fertilization compared to urine, due to the ability to release N slowly.

Key words: Nitrous oxide, secondary metabolites, urine and feces.

CAPÍTULO I

1. Introducción

Las emisiones netas de gases de efecto invernadero antropogénicas han continuado aumentando en las últimas décadas. Entre el periodo 2001-2010, las emisiones fueron aproximadamente de 44 000 Mt CO₂ eq, siendo un 20% atribuido a los diferentes usos agrícolas del suelo como procesos vinculados a la fermentación entérica, la gestión del estiércol, el cultivo del arroz, los fertilizantes sintéticos, el estiércol depositado en las pasturas, el cultivo de suelos orgánicos, la descomposición de los residuos agrícolas, la quema prescrita de sabanas y la quema de residuos agrícolas en el campo. Estos usos de la tierra han incrementado sus emisiones en un 8% desde una media de 7497 Mt CO₂ eq en la década de 1990 hasta 8103 Mt CO₂ eq en la de los 2000 (Tubiello *et al.* 2014).

El aumento en la concentración de gases de efecto invernadero (GEI) provoca una alteración en el sistema del clima, que se traduce en un calentamiento de la atmósfera (IPCC 2014). El dióxido de carbono (CO₂), el metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O), considerados principales GEI por su abundancia en la atmósfera, donde absorben y remiten la radiación de onda larga, provocan cambios de temperatura atmosférica (IPCC 2014). Las concentraciones de los principales GEI en el 2010 correspondían a un 31% más que las registradas en el año 1990, aumentando en 40%, 150% y 20% respectivamente (IPCC 2013). Estas concentraciones en la atmosfera se encuentran en niveles sin precedentes en los últimos 800.000 años (IPCC 2013, 2014).

En las últimas décadas los estudios sobre GEI en gran parte se han orientado hacia CO₂ el cual, ciertamente, es el GEI más abundante en la atmosfera pero se debe reconocer la importancia del CH₄ y el N₂O, ya que junto al metano de la fermentación entérica y el N₂O en el suelo se encuentran entre las principales fuentes de GEI en la agricultura (IPCC 2007, Tubiello *et al.* 2014). Además estos gases cuentan con un potencial alto de efecto invernadero, siendo el CH₄ 23 veces más potente que el CO₂ y el N₂O aproximadamente 310 veces más que CO₂ (IPCC 2014). Entre el periodo 2001-2011, el N₂O en el suelo fue responsable del 29% de las emisiones agrícolas, siendo las excretas depositadas en el suelo una fuente principal (Hristov *et al.* 2013). En Costa Rica, el sector agrícola se considera responsable del 37% del total de emisiones de GEI, siendo la ganadería uno de las principales fuentes. Del total de emisiones, el 54% es N₂O (World Bank 2014). Así mismo, se estima que para la región, el sector ganadero es responsable del 23,5% del total de emisiones de GEI (Chacón *et al.* 2014).

Se estima que la ganadería produce alrededor de 18% de las emisiones totales de la agricultura (Steinfeld *et al.* 2009). En las próximas décadas, la ganadería será responsable de gran parte del calentamiento global (Steinfeld *et al.* 2009, Tubiello *et al.* 2014). En la gestión del estiércol, las emisiones (CH₄ y N₂O) han incrementado en los últimos años (333 Mt CO₂-eq en la década de 1990 y 341 Mt CO₂-eq en la década de los 2000), y el incremento podría alcanzar un 47% para el 2050 (Tubiello *et al.* 2014). Por otro lado, cuando Steinfeld *et al.* (2009) estimaron las emisiones procedentes de la ganadería, encontraron que la gestión del estiércol podría significar 2,2 Gt CO₂-eq año⁻¹, superado por las 2,5 Gt CO₂ eq año⁻¹ de la actividad de uso y cambio de uso del suelo.

En el año 2011 las emisiones procedentes del estiércol aplicado a los suelos y el estiércol depositado en pasturas, consistentes en el gas óxido nitroso, fueron aproximadamente un 4% y 15% respectivamente de las emisiones totales de la agricultura, siendo el ganado vacuno el que aporta el 45% y 62% de las emisiones totales de estas dos fuentes respectivamente (Tubiello *et al.* 2014).

En ganadería de pastoreo existen grandes ingresos de nitrógeno al suelo en forma de excretas (heces y orina) del animal, debido al bajo aprovechamiento de las proteínas en el sistema digestivo de rumiantes (McSweeney *et al.* 2001). La deposición de estos puntos de alta concentración de N en el suelo permite procesos de nitrificación y desnitrificación, lo que fácilmente se podría traducir en emisiones de N₂O, principalmente el nitrógeno (N) procedente de orina debido a su alta susceptibilidad a la degradación (Saggar *et al.* 2004, Hyde *et al.* 2006, Luo *et al.* 2010). Las pérdidas de N como N₂O y otras formas como lixiviación NO₃⁻ o volatilización de NH₃⁺ (van Groenigen *et al.* 2015; García-Velazquez y Gallardo 2017), junto a la alta actividad microbiana alrededor de este elemento, lo convierten en un nutriente muy limitante en los suelos agrícolas, además es probable que el N se encuentre en formas no disponibles para las plantas o simplemente no se encuentre en el suelo, limitando el potencial productivo de los sistemas agropecuarios (Follet 2001, van Groenigen *et al.* 2015), de forma que se hace importante buscar prácticas que reduzcan las pérdidas de N.

Sabiendo que el incremento de la producción ganadera en la región ha llevado a la degradación de los recursos naturales (Tubiello *et al.* 2014), la presión de políticas internacionales que velan por la conservación de los ecosistemas, han provocado que la agricultura moderna se vea en la necesidad de evolucionar hacia un enfoque productivo que también considere la conservación de los recursos naturales como parte del sistema productivo (Foley *et al.* 2005, Kareiva *et al.* 2007). Lo anterior motiva a desarrollar sistemas de producción de alimentos bajo ciertas prácticas que promuevan la conservación de los ecosistemas naturales (Robertson y Swinton 2005, Bennett *et al.* 2009, Pretty *et al.* 2011).

Se considera que la principal razón de las pérdidas de N en las excretas es su uso excesivo en la dieta, sumado a un desbalance en los nutrimentos (Messman *et al.* 1992, Huhtanen *et al.* 2008, Huhtanen y Hristov 2009). Sin embargo, encontrar un balance implica la consideración de muchos factores involucrados en el sistema digestivo de los rumiantes. Entre las soluciones que se proponen para la reducción de emisiones N₂O en la ganadería, se encuentra el uso de especies forrajeras ricas en metabolitos secundarios, capaces de disminuir la degradabilidad temprana de la proteína debido a sus características físicas y/o químicas (Pérez-Maldonado y Norton 1996, Flores *et al.* 1999), consiguiendo una reducción de las pérdidas de N a través de la orina. De esta manera aumentaría el paso de la proteína hacia el duodeno con dos posibles destinos (Reynolds *et al.* 1992, Annison y Bryden 1999), la absorción de la proteína a través de las paredes del intestino para su respectivo aprovechamiento o bien la excreción a través de las heces donde el N sería menos susceptible a pérdidas en el suelo (Lou *et al.* 2014), con la capacidad de reducir las emisiones de N₂O en pastoreo (Flores *et al.* 1999, McSweeney *et al.* 2001, Hess *et al.* 2004). Por otro lado, cuando el efecto está dado principalmente por metabolitos secundarios de las plantas (taninos, saponinas y otros), determinar la dosis adecuada se convierte en un reto, debido a que estos compuestos podrían producir efectos anti-nutricionales y reducción en el rendimiento animal (Flores *et al.* 1999, Waghorn 2008, Grainger *et al.* 2009, Jayanegara *et al.* 2012).

Por sus cualidades agronómicas y bromatológicas *Tithonia diversifolia*, también conocida como “botón de oro”, es una planta con alto potencial forrajero (Medina *et al.* 2009, Verdecia *et al.* 2011, Ruíz *et al.* 2016). Esta especie es reconocida por su capacidad de acumulación de proteína en las hojas (Medina *et al.* 2009, Verdecia *et al.* 2011), combinada con un buen aporte de contenido fibroso (Naranjo y Cuartas 2011). Además, se ha hecho referencia en cuanto al contenido de carbohidratos no estructurales de dicha forrajera (Medina *et al.* 2009), lo que podría potencializar el aprovechamiento de la proteína en el rumen. Según Galindo *et al.* (2011), botón de oro (BO) presenta un contenido variable de polifenoles, taninos y saponinas; sin embargo, los contenidos no son elevados (Maina *et al.* 2012), de manera que esta planta ha sido considerada como una fuente prometedora de nutrimentos en la ganadería. A razón de lo expuesto, el presente trabajo pretende contribuir a los esfuerzos por una ganadería sostenible, evaluando el potencial de *T. diversifolia* como una alternativa para la reducción de N excretado en heces y orina, y la consecuente contribución a la disminución de las pérdidas por N₂O.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar el potencial de *Tithonia diversifolia* para reducir las emisiones de óxido nitroso en un sistema de producción de leche.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar la variación en proporción del nitrógeno en las excretas de vacas suplementadas con *Tithonia diversifolia*.
- Calcular los flujos de óxido nitroso en pasturas después de depositar excretas provenientes de vacas alimentadas con *Tithonia diversifolia*.

3. Revisión de literatura

3.1 Ciclo del nitrógeno y su participación en la ganadería

Se considera que alrededor del 78% del N atmosférico se encuentra en su forma no reactiva N_2 (Galloway *et al.* 2004). Sin embargo, se pueden encontrar otras cantidades de moléculas reactivas importantes de este elemento (NH_3 , NH_4 , NO, NO_2 , HNO_3 , N_2O , HONO, PAN y otros compuestos). Al traslado del N en sus diferentes formas se le llama ciclo biogeoquímico del N, el cual se lleva a cabo por diferentes procesos de fijación, acumulación, translocación entre otros. La dinámica del N se considera importante porque estudios han demostrado que es un elemento altamente involucrado en el balance bioquímico de ecosistemas naturales, con capacidad de limitar la producción de dichos ecosistemas (Vitousek *et al.* 2002, Galloway *et al.* 2004, Luo *et al.* 2011, Fowler *et al.* 2013). A pesar de ser un elemento muy abundante en la naturaleza, los compuestos reactivos son altamente susceptibles a cambios de temperatura, precipitación, concentración de C y otras alteraciones (Galloway *et al.* 2008).

Debido a la importancia del N y la complejidad de su ciclo biogeoquímico, este elemento ha sido estudiado a profundidad. Actualmente se conocen los grandes componentes del ciclo del N así como sus múltiples procesos y transformaciones; sin embargo, hasta finales del siglo XVIII poco se sabía sobre el N en la producción de ecosistemas. Por la experiencia en algunos cultivos se creía que el uso de algunas leguminosas y el estiércol mejoraban los rendimientos de las plantas (Boussingault 1841, Galloway *et al.* 2016), pero no se sabía con certeza el por qué de estos efectos ni la participación del N, de manera que era muy poca la intervención del hombre en el ciclo del N. La transformación de N inactivo (N_2) en nitrógeno reactivo (otras formas químicas) se daba de forma natural a través de la fijación biótica correspondiente a microorganismos especializados y la fijación abiótica por la acción de los rayos. El descubrimiento oficial del N y gases como amonio y óxido nitroso en muestras de aire a finales del siglo XVIII, junto con los conocimientos adquiridos sobre el papel del N en la nutrición de las plantas durante el siglo XIX (Smil 2001), dieron inicio a una carrera para encontrar formas de producir nitrógeno reactivo y disponible para mejorar los rendimientos en la producción de alimentos (Smil 2001, Galloway *et al.* 2016). Es así como en las primeras décadas del siglo XX, gracias a los estudios del químico alemán Fritz Haber y la continuación por Carl Bosch, se logra un método artificial para transformar N molecular (N_2) a N reactivo, método que se logró llevar a gran escala en la década de 1970.

En la actualidad se sabe que el N forma parte muy importante de los seres vivos para la producción de proteínas, ADN y otros compuestos importantes; sin embargo, la complejidad se encuentra en que pocos organismos tienen la capacidad de romper el triple enlace de su molécula más abundante en la naturaleza (N_2), trabajo que requiere de mucha energía (Philippot y Germon 2005). Además, moléculas de amonio y nitrato, las principales formas asimilables para la mayoría de organismos (Vitousek y Matson 1985), son muy inestables y sensibles a las variables ambientales. De manera que se puede definir como primer paso del ciclo cuando el N atmosférico pasa de N inactivo a N reactivo para ingresar a los diferentes ecosistemas, proceso conocido como fijación de N_2 , lo cual puede ocurrir de forma biótica por acción de bacterias que se encuentran en el suelo y agua en vida libre o en simbiosis con plantas, de forma abiótica por acción de los rayos oxidando el N atmosférico y también por la acción humana a través del método de Haber-Bosch o por combustión de combustibles

fósiles. El N aportado por desechos de cultivos y de animales y plantas en general, también se considera como una importante fuente de N en los ecosistemas. Debido a su condición orgánica, este N debe ser mineralizado por agentes abióticos y bióticos, proceso conocido como amonificación.

Estudios reconocen que el ciclo del N en los ecosistemas tiene diversas entradas y salidas. Inclusive se ha identificado que al realizar el balance en suelos, son mayores las entradas que salidas (Bouwman *et al.* 2005, Davidson *et al.* 2012). El N en el suelo es altamente inestable y puede sufrir varias transformaciones. Una vez que se encuentra en forma reactiva, inicia una serie de procesos que pueden resultar en la asimilación por la vegetación; pero en realidad, solo una porción es aprovechada por las plantas debido a los diversos factores que intervienen en el suelo. Una vez que el N se encuentra en forma amoniacal (NH_3) puede ser absorbido por las plantas, fijado por arcillas, volatilizado por el viento o puede ser tomado por bacterias autotróficas para iniciar un proceso llamado nitrificación en el cual se generan nitritos (NO_2) y seguidamente nitratos (NO_3). Estos últimos pueden ser utilizados por microorganismos o asimilado por las plantas; si esto no ocurre, el nitrato puede pasar a la desnitrificación en la cual se obtiene como producto final N_2 que es emitido nuevamente a la atmósfera. Se estima que después de los procesos de nitrificación y desnitrificación, el N absorbido por las plantas no es mayor al 60% de lo aplicado en fertilización (Janzen *et al.* 2003, Lassaletta *et al.* 2014); el resto podría perderse debido a escapes, por lixiviación, pérdidas por escorrentía contaminando cursos de agua, en forma gaseosa que contribuye al calentamiento global, entre otros. Estos procesos envuelven diversas etapas y organismos siendo muy importantes para la gestión del N en los sistemas de producción debido a que aquí pueden ocurrir pérdidas considerables de N en diferentes formas como el nitrato (NO_3) uno de los principales causantes de la contaminación del agua o el gas de efecto invernadero óxido nitroso (Galloway *et al.* 2016), un tema de importancia en los sistemas de ganadería principalmente en pastoreo, debido a las grandes entradas de N en el suelo a través de la fertilización de pasturas y deposición de excretas. Estas pérdidas de N tienen repercusiones para el medio ambiente comprometiendo el equilibrio de los ecosistemas (Compton *et al.* 2011, Davidson *et al.* 2012), por lo que se considera que mejorar la eficiencia en el uso de N tendrá cambios positivos en la sostenibilidad de los ecosistemas (Davidson *et al.* 2012, Hristov *et al.* 2013).

Dentro de un sistema de pastoreo, usualmente, las entradas de N en alimentos y fertilizantes son mayores que las salidas en leche, animales vendidos y cultivos (VandeHaar y St-Pierre 2006). Es decir que esto puede provocar saturaciones de N en el suelo que no pueden ser aprovechadas por las plantas y microorganismos, lo que generalmente se puede convertir en pérdidas de este elemento. El proceso que el N pasa mientras se encuentra en el suelo, se puede dividir en dos fases: nitrificación y desnitrificación. La volatilización del amoníaco es la principal vía de pérdida de N del estiércol (Harper *et al.* 2004, Lee *et al.* 2011), pérdidas que por lo general representan entre el 30 y el 70 por ciento del contenido de N amoniacal del estiércol bovino (Thompson y Meisinger 2002). Sin embargo, estos escapes en forma amoniacal son causa importante de partidas en otras vías como lixiviación o emisiones de N_2O . Las emisiones de N también pueden ser en forma de gas di-nitrógeno N_2 (Harper *et al.* 2004). La proporción de N en el estiércol que se pierde como N_2O es relativamente baja, generalmente inferior al 2 o 3 por ciento del N que entra en el estiércol y sólo en pocos trabajos se han registrado niveles del 10 por ciento (de Klein *et al.* 2001).

Inicialmente las pérdidas por emisiones directas de N_2O de excretas de vacas depende de la composición del estiércol y de la orina, lo cual se suma a los factores involucrados en la nitrificación y desnitrificación (Chadwick *et al.* 2011, Van Groenigen *et al.* 2015).

3.2 Nitrificación

Es el proceso aeróbico por el cual el nitrógeno en forma de amonio (NH_4^+) al oxidarse se transforma en nitritos (NO_2^-) para luego pasar a nitratos (NO_3^-); los microorganismos encargados de este proceso son llamados nitrificadores. Dentro de la nitrificación se pueden describir dos etapas principales para cumplir el proceso. La primera es conocida como amonia-oxidación, la cual se lleva a cabo por microorganismos autótrofos llamados bacterias amonia-oxidantes que aprovechan el amoniaco como fuente de energía para la fijación de dióxido de carbono. Estas bacterias pertenecen a los géneros nitrosococcus, nitrosomonas y nitrospira (Bock y Wagner 2006). Recientemente se ha descubierto otro grupo diferente de microorganismos que también se encargan de la oxidación de amonia, los cuales son conocidos como arqueas amonia-oxidantes. Estos últimos, a diferencia del primer grupo, son arqueas, teóricamente con alta capacidad para la producción de N_2O , aunque oxidan amonia y producen N_2 como las bacterias amonia-oxidantes, llevan a cabo el proceso con ciertas diferencias (Konneke *et al.* 2005, Walker *et al.* 2010), tienen una alta capacidad de producción de N_2O , sin embargo no se sabe con certeza cuáles son sus vías de producción (Santoro *et al.* 2011). La segunda etapa de la nitrificación es realizada por microorganismos autotróficos conocidos como bacterias nitrito-oxidantes, los cuales se encargan de oxidar el nitrito y se obtiene como producto final el NO_3^- . Hasta el momento no se sabe de otro grupo de microorganismos que participen en esta etapa (Bock y Wagner 2006).

Por otro lado, por acción de las bacterias amonio-oxidantes se puede formar N_2O a partir de dos vías. Una de ellas antes de pasar a nitritos, el N sufre una transformación intermedia hidroxilaminar (NH_2OH) de la cual puede generarse espontáneamente N_2O (Van Groenigen *et al.* 2015); la otra vía para la producción de este gas de efecto invernadero es un proceso particularmente anaeróbico conocido como *nitrifier denitrification*, poco estudiado hasta hace algunos años (Wrage *et al.* 2001, Casciotti y Ward 2005). Sin embargo, en la última década se ha revelado su gran potencial de producción de N_2O (Zhu *et al.* 2013, Van Groenigen *et al.* 2015). *Nitrifier denitrification* está dada por bacterias nitrificantes que contienen genes característicos de los microorganismos denitrificadores; de esta manera logran producir NO y posteriormente N_2O durante la nitrificación, bajo condiciones anaeróbicas (Van Groenigen *et al.* 2015).

La disponibilidad de amonio (NH_4^+) y oxígeno en el suelo podrían estar entre los factores más importantes para que ocurra la nitrificación, así como la producción N_2O (Firestone y Davidson 1989, Newell *et al.* 2013). Sin embargo, la complejidad de la nitrificación y la especificidad del N_2O , no permiten claridad al momento de definir las condiciones óptimas para la producción de este gas en dicho proceso (Zhu *et al.* 2013, Van Groenigen *et al.* 2015). Existen otras variables como la humedad, temperatura y textura, las cuales han sido consideradas cada vez más como variables determinantes en las distintas etapas de la nitrificación, al igual que las tasas de producción de N_2O , reconociendo que cada etapa depende de la combinación de muchas variables (Zhu *et al.* 2013, Van Groenigen *et al.* 2015). Por ejemplo, podríamos pensar que la concentración N es la variable más influyente en las emisiones de N_2O dentro de la nitrificación, así como la fertilización de suelos o el pastoreo tienen una relación positiva con la producción de este gas (Carter 2007, Le Roux *et al.* 2007), probablemente

porque se generan las condiciones favorables para la actividad nitrificante (Wrage *et al.* 2018). Se ha visto que el tema podría ser más complejo, al parecer la disponibilidad de N como variable para la producción de N₂O también va depender de las diferentes vías de nitrificación y estas a su vez pueden estar influenciadas por condiciones propias del sustrato o variables ambientales (Zhu *et al.* 2013). Es decir que, es de gran importancia saber en cuales formas se concentra el N en determinadas condiciones ya que las tasas de producción de N₂O van a depender si la condiciones son favorables para la acción de bacterias nitrificadoras, archeas nitrificadoras o para *nitrifier denitrification* (Wrage *et al.* 2018). En ese sentido, Zhue *et al.* (2013) reportaron que la producción de N₂O por *nitrifier nitrification* fue mayor cuando se aplicó urea que cuando se aplicó sulfato de amonio.

También la humedad, temperatura y textura, se han considerado como variables principales influyentes en la nitrificación, reconociendo que cada etapa depende de la combinación de muchas variables. Se considera que la humedad del suelo determina las emisiones de N₂O en la nitrificación, debido a los requisitos aeróbicos de los microorganismos involucrados; estos nitrificadores se ven favorecidos en ambientes con baja concentración de agua (Linn y Doran 1984, Bateman y Baggs 2005). Por otro lado, dicha actividad podría ser más compleja porque detrás de la humedad existen otras co-variables que pueden influir en la producción de N₂O (Zhu *et al.* 2013). Además se ha demostrado que, a partir de *nitrifier denitrification*, la nitrificación es capaz de producir N₂O en condiciones anaeróbicas (Wrage *et al.* 2001), pero eso no descarta que la producción de este gas a través de *nitrifier nitrification* podría darse bajo un considerable rango de concentración de oxígeno (Zhu *et al.* 2013). De manera que es posible que en ciertas condiciones la producción de N₂O en la nitrificación esté más asociada a la presencia de NO₂ que O₂ (Zhang *et al.* 2015). Sin embargo, hasta el momento esto no está claro (Yamazaki *et al.* 2014, Wrage *et al.* 2018).

Stevens y Laughlin (2001), encontraron que la desnitrificación fue responsable de la producción de N₂O durante su experimento; sin embargo, durante el mes de agosto la nitrificación produjo el 10% de este gas, dejando en evidencia el efecto de variables ambientales. Con respecto a la temperatura, aunque esta variable es influyente en la actividad nitrificante y desnitrificante (Focht y Verstraete 1997), hasta el momento no se tiene un conocimiento profundo sobre la interacción con las vías de producción de N₂O en la nitrificación (Wrage *et al.* 2018). Sin embargo, algunos estudios han encontrado de forma general que la actividad de la nitrificación y desnitrificación están relacionadas con los cambios de temperatura, entre rangos aproximados de 15 a 25°C para nitrificación y hasta 35°C para la desnitrificación (Standford *et al.* 1975, Dalias *et al.* 2002), lo cual podría relacionarse con la producción de N₂O (Wrage *et al.* 2018). Benoit *et al.* (2015) concluyeron en un experimento que la producción óptima de este gas en la nitrificación podría darse a una temperatura de 42°C, mientras que la desnitrificación a 54°C.

Las concentraciones de materia orgánica o disponibilidad de carbono podrían ser variables influyentes en las emisiones de N₂O durante la nitrificación, como lo plantean Blagodatskaya *et al.* (2014), quienes reportaron que sustratos orgánicos produjeron menor cantidad de este gas. Entendiendo las comunidades microbianas que participan en la mineralización de N, a una baja disponibilidad de carbono (C) liberan N en forma amoniacal como un mecanismo de regulación (Mooshammer *et al.* 2014). De manera que a baja disponibilidad de C en el suelo, aumentaría la producción de N₂O (Wrage *et al.* 2018). Aunque este podría ser válido solo para nitrificación, como ha sido reportado en algunos casos (Köster *et al.* 2011).

El NO_3 resultante por la nitrificación puede ser absorbido por las plantas (una de las dos formas de absorción), inmovilizado por los microorganismos, lixiviado a través del suelo, fijado por las arcillas cuando estas presentan cargas positivas o pasar a la desnitrificación (Van Groenigen *et al.* 2015).

3.3 Desnitrificación

Mientras la nitrificación requiere condiciones aeróbicas, la desnitrificación se produce en condiciones anaeróbicas. Este proceso biológico es realizado por varios microorganismos heterótrofos como: *Bacillus denitrificans*, *Vibrio denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans* que son bacterias anaeróbicas; o bien por hongos y arqueas desnitrificadoras (Sutka *et al.* 2008, Rohe *et al.* 2014, Maeda *et al.* 2015), que transforman el NO_3 y nitrito (NO_2^-) a gases óxido nítrico (NO), óxido nitroso y di-nitrógeno (Wrage *et al.* 2001, Garbeva 2007, van Groenigen *et al.* 2015). La síntesis de estos compuestos se logra a través de enzimas conocidas como nitrato reductasa, nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa. Estas enzimas se activan de forma secuencial al ocurrir una condición anaeróbica (Tavares *et al.* 2006): nitrato reductasa de 2-4 horas, nitrito reductasa entre 2 y 12 horas y óxido nítrico reductasa 24- 48 horas. Se considera que muchos de los microorganismos que participan en la desnitrificación carecen de la enzima N_2O reductasa, principalmente en suelos donde la rizosfera está compuesta mayormente por hongos, como en suelos de pasturas templadas (Saggar *et al.* 2012), lo que llevaría a creer que el N_2O puede ser un producto final de gran relevancia en este proceso (Philippot *et al.* 2011).

Algunos autores consideran que la mayor pérdida de N en forma de gas se da en la desnitrificación, lo cual podría oscilar entre 0-60% (Kroeze *et al.* 1999, Saggar *et al.* 2012). Sin embargo, eso va depender de diversos factores o condiciones ambientales. Saggar *et al.* (2012) identifican dos tipos de factores influyentes en la desnitrificación, llamados proximal y distal. El primer grupo corresponde a disponibilidades de NO_3 , C, concentración de oxígeno y la temperatura; por otro lado, el segundo grupo corresponde a factores que afectan a las comunidades desnitrificadoras de forma mediata como las prácticas de manejo, el tipo y la cobertura del suelo. En forma general se sabe que la disponibilidad de N (NO_3) es el factor determinante para desencadenar altas tasas de desnitrificación (Zaman *et al.* 2007). Los suelos de pasturas pueden considerarse propensos a la actividad desnitrificante debido a las concentraciones altas de NO_3 en los parches de orina (Saggar *et al.* 2004). Por otro lado Köster *et al.* (2011), reportaron que la desnitrificación (incluyendo *nitrifier desnitrification*) era la mayor fuente de N_2O mientras la disponibilidad de C era alta; sin embargo, después de que el C se metabolizó, la nitrificación pasó a ser la principal fuente de N_2O . Los suelos de pasturas almacenan considerables cantidades de C en la superficie, debido a la producción permanente de biomasa o por la aplicación de desechos (Barton *et al.* 1999, Chadwick *et al.* 2000).

3.4 Emisiones de óxido nitroso en sistemas de pastoreo (estiércol y orina)

Las emisiones de N_2O pueden ser especialmente altas en los sistemas de pastoreo intensivo debido a la elevada concentración de N en la orina, como resultado del alto contenido de la proteína cruda (PC) en los pastizales (Hristov *et al.* 2013). Dentro de los suelos dedicados a actividades agropecuarias, los pastizales son considerados la mayor fuente de N_2O , principalmente, los utilizados para el pastoreo animal debido a los aportes de estiércol y orina. Se estima que a través de la orina y el estiércol se excreta entre el 75 y el 90% del N consumido por la ganadería de pastoreo (Luo *et al.* 2010). Las emisiones totales de N_2O de los sistemas de producción animal se estiman en 1,5 Tg. Las heces y la orina de los animales de pastoreo depositados en pastos representa el 41%.

Proyecciones de la FAO sugieren que el número de animales en ganadería aumentaría un 40% entre el 2000 y 2030. La media de excreción de N por animal, probablemente también aumentará (FAO 2001, Tubiello *et al.* 2014).

Eckard *et al.* (2010), mencionan que la tasa de aplicación de N efectiva en el parche de orina de una vaca lechera en pastoreo podría estar entre 800 y 1300 kg N ha⁻¹, concentraciones mucho mayores que la capacidad de uso del sistema suelo y planta. Estos autores sugirieron que una distribución más uniforme de la orina en la parcela reduciría la tasa de aplicación efectiva, lo cual se debería traducir en una reducción de las emisiones de N₂O. Este gas se emite en gran parte durante procesos de transformación macrobiamente del N en el suelo, derivado de residuos de cultivos y la aplicación de fertilizantes inorgánicos y orgánicos. En la agricultura desarrollada, el N absorbido por los cultivos no suele representar más del 60% de la cantidad aplicada.

La incertidumbre en la estimación de emisiones es grande, debido a la complejidad de variables involucradas y la falta de datos precisos, especialmente sobre la excreción de N y la gestión de los residuos de origen animal en la práctica (Hristov *et al.* 2013). En la mayoría de los sistemas de producción de forraje, los nutrientes esenciales necesarios para el crecimiento de las plantas son proporcionados por diferentes fuentes en el ecosistema. En general, las praderas de clima cálido se caracterizan por sistemas de pastoreo extensivo con un mínimo de insumos de fertilizantes comerciales y alimentación suplementaria, principalmente debido a la desfavorable economía de la fertilización o la disponibilidad limitada de material fertilizante. La baja disponibilidad de N en el suelo es una limitación importante en sistemas de pasturas tropicales y subtropicales y representa una de las principales causas de los pastos degradados (Hristov *et al.* 2013). Se estima que el nitrógeno aportado al suelo en forma de excreta animal es más propenso a convertirse en N₂O que el incorporado en forma de N sintético (Clayton *et al.* 1997).

Sin embargo, esto no siempre parece ser el caso, ya que algunos estudios presentan emisiones mayores de N₂O en suelos fertilizados con nitrato amónico (Chantigny *et al.* 2010), o urea (López-Fernández *et al.* 2007), comparados con suelos enmendados con estiércol. Además, Pelster *et al.* (2012) encontraron que la tasa de emisión de N₂O para parcelas enmendadas con estiércol de aves fue un 1,8 por ciento más elevada, más del doble que el de otros tratamientos, incluidos los fertilizantes minerales (0,3 a 0,9%), un resultado atribuido al alto contenido de C en el estiércol de las aves. Estos autores concluyeron que, comparado con fuentes de N mineral, la aplicación del estiércol incrementa el flujo del N₂O en los suelos con bajo contenido de C.

3.5 El estiércol en ganadería

El estiércol es una fuente valiosa de nutrientes disponible para los cultivos que reemplaza exitosamente a los fertilizantes artificiales. Las emisiones de N₂O del suelo debido a la aplicación de fertilizantes nitrogenados inorgánicos pueden ser significativas. Un informe del IPCC (2006), asumió tasas de emisión de N₂O (nivel 1) para fertilizantes minerales y estiércol de vacunos, aves y cerdos, del 1 y 2% de la adición de N, respectivamente.

Las emisiones del N₂O del suelo pueden variar ampliamente. Se han reportado tasas de emisión de hasta un 12% del N adicionado (para fertilizantes basados en nitratos) y 5% para el estiércol (de Klein *et al.* 2001). Petersen (1999) no encontró ninguna diferencia en emisiones del suelo (en ambos casos menores al 1% del N adicionado) entre fertilizantes sintéticos (nitrato amónico cálcico) y una

mezcla de estiércol de ganado vacuno y de cerdos. De manera similar, Li *et al.* (2002) no observaron diferencias en las emisiones de N₂O en suelos entre el estiércol de vacunos y un fertilizante de sulfato amónico aplicado a razón de 150 o 300 kg N ha⁻¹. Una diferencia importante entre los fertilizantes minerales y el estiércol, es que este último contiene C orgánico, el cual, dependiendo de las condiciones del suelo, puede afectar las emisiones de N₂O. El C del estiércol puede incrementar la tasa de respiración microbiana en el suelo, además agota el oxígeno y provee las condiciones anaerobias requeridas para la desnitrificación (Pelster *et al.* 2012). Como resultado, las enmiendas orgánicas (estiércol de vacunos, cerdos y aves) contienen grandes cantidades de C lábil y de N disponible y se ha reportado que incrementan la emisión de N₂O del suelo si se compara con los fertilizantes minerales.

Sin embargo, esto no siempre parece ser el caso ya que algunos estudios presentan emisiones mayores de N₂O en suelos fertilizados con nitrato amónico (Chantigny *et al.* 2013) o urea (López-Fernández *et al.* 2007) comparados con suelos enmendados con estiércol. Además, Pelster *et al.* (2012) encontraron que la tasa de emisión de N₂O para parcelas enmendadas con estiércol de aves fue un 1,8% más elevada, más del doble que el de otros tratamientos, incluidos los fertilizantes minerales (0,3 a 0,9%), un resultado atribuido al alto contenido de C en el estiércol de las aves. Estos autores concluyeron que, comparado con fuentes de N mineral, la aplicación del estiércol incrementa el flujo del N₂O en los suelos con bajo contenido de C.

3.6 Prácticas recomendadas para la reducción de emisiones de óxido nitroso

La reducción en las emisiones de N₂O está muy asociada al uso eficiente del N dentro de un sistema (Sutton y Bleeker 2013, Skiba *et al.* 2012). Por eso la mayoría de prácticas utilizadas para el uso eficiente de este mineral, responden a problemas de pérdidas a través de emisiones de óxido nitroso. Por ejemplo, las características de la dieta pueden causar un profundo efecto en las pérdidas de N, que en algunos casos podría cambiar la ruta de excreción de N de los rumiantes (heces y orina) depositando N más estable en el suelo (Flores *et al.* 1999, Lou *et al.* 2015). De igual forma la manipulación de la dieta ha demostrado ser un medio eficaz para reducir las emisiones de NH₃ de los suelos porque la disminución de la PC en la alimentación produce estiércol con una tasa de mineralización del N más baja (Powell *et al.* 2011). Además, reducir la PC en la dieta y proteína degradable en el rumen (PDR) es una estrategia eficaz para reducir de la excreción de urea, la concentración de NH₃ y potencialmente de las emisiones de N₂O del estiércol de vacas lecheras (Godden *et al.* 2001, Frank y Swensson 2002).

Según Luo *et al.* (2010), la reducción de las emisiones de N₂O de los sistemas de pastoreo intensivo se puede lograr mediante varias estrategias, ideas que son compartidas por diversos autores (Hristov *et al.* 2013), como el mejoramiento de la eficiencia en el uso del N mediante la reducción del N excretado por los animales en pastoreo; la optimización del manejo del suelo y los insumos nitrogenados; la optimización de las pasturas mediante su renovación; la manipulación de los procesos del ciclo del N mediante aditivos aplicados al suelo; la selección de las plantas y los animales que maximicen la utilización del N; la introducción de cambios en el manejo del pastoreo y de la alimentación. Por otro lado, De Klein y Eckard (2008) mencionan algunas estrategias para la mitigación de emisiones de N₂O en ganadería, como diluir el N en la orina a través de la inclusión de sal en la dieta, con lo cual se estima una reducción de emisiones entre 5 y 10%; la selección animal, que podría resultar en la reducción de un 3% del N excretado en la orina, sin embargo, esta

estrategia es asociada a una baja demanda de N en la dieta. Así mismo se menciona una reducción del N en la dieta, lo cual podría significar una reducción de 10 a 45% de N urinario, pero debido a sus implicaciones, no es una estrategia práctica para producciones intensivas, como lo indican Hristov *et al.* (2013). Finalmente se considera una adecuada administración de los fertilizantes, considerando el tipo, tasa y época de aplicación, y el uso de inhibidores de la nitrificación.

La idea general que implica mejorar el uso del N en la alimentación de los rumiantes podría considerarse como una alternativa prometedora para mitigar las emisiones de N₂O (De Klein y Eckard 2008, Luo *et al.* 2010), debido a que esta eficiencia resultaría en una menor excreción del N en la orina (Luo *et al.* 2015). Posicionada como buena alternativa, el uso de plantas con propiedades precursoras del uso eficiente del N en la digestión ruminal (Flores *et al.* 1999), es una práctica que promete reducir las emisiones de N₂O en los suelos de pasturas (Lou *et al.* 2015). Esto puede atribuirse a las propiedades físicas y químicas de estos forrajes alternativos. Flores *et al.* (1999) evaluaron el cambio de ruta del N de orina a heces y concluyeron que la suplementación con *Calliandra calothyrsus* redujo la excreción del N en la orina, mostrando un aumento en las heces, lo cual se atribuyó a los compuestos secundarios contenidos en este forraje.

3.7 Metabolitos secundarios en las plantas y sus efectos en el uso del N

Son estructuras fitoquímicas consideradas parte del metabolismo secundario en las plantas. Entre estos compuestos se conocen polifenoles, aminoácidos no proteicos, cianógenos, alcaloides y saponinas, entre otros (Santra *et al.* 2012, Patra y Saxena 2010). Estos metabolitos se han llamado también compuestos antinutricionales por su capacidad para producir trastornos en los sistemas digestivos (Acamovic y Brooker 2005); su condición de metabolitos secundarios ha provocado muchas preguntas sobre sus funciones dentro del organismo de las plantas, entre las primeras teorías se dice que estos compuestos son sintetizados para la defensa contra herbívoros. Por otro lado, existen muchas investigaciones que resaltan diferentes funciones de dichos compuestos, como atrayentes para la polinización, coloración, reservas de N, entre otros (Acamovic y Brooker 2005). En las plantas, estos compuestos son sintetizados en un sitio específico y luego son transportados a los diferentes lugares de almacenamiento como vacuolas, lípidos, membranas tilacoides o cutícula (Wiermann 1981). También pueden ser específicos de tejidos como flores, frutos, raíces, cortezas y bulbos (Acamovic y Brooker 2005).

Varios estudios han demostrado que estos metabolitos también contienen características que podrían beneficiar el uso de los nutrientes en la digestión de rumiantes (Hess *et al.* 2004, Bento *et al.* 2005, Rira *et al.* 2014), con un alto potencial para la reducción de metano por la fermentación entérica o promover el uso eficiente de N ruminal, lo cual podría resultar en una disminución de las pérdidas de N en el suelo, como N₂O (Hess *et al.* 2004, Hess *et al.* 2006, Luo *et al.* 2015).

Las investigaciones existentes se han inclinado mayormente hacia el uso de taninos y saponinas como compuestos secundarios para el uso eficiente del N en el sistema digestivo (Hristov *et al.* 2013). Los taninos son compuestos polifenólicos con estructuras abundantes en grupo hidróxilo, acompañados por otros grupos. Dependiendo del grado de polimerización y peso molecular, estos pueden generar la capacidad de formar complejos con enlaces altamente estables reversibles y no reversibles con las proteínas y otras macromoléculas como los polisacáridos, alcaloides, minerales y otros (Reed 2010, Patra y Saxena 2010, Vázquez *et al.* 2012). Se pueden mencionar tres grupos de taninos: los

florotaninos, los taninos hidrolizables y los taninos condensados (Reed 1995). Los florotaninos se han encontrado recientemente, son considerados exclusivos de algunas algas marinas (Van Alstyne 1999). Los taninos hidrolizables son los más diversos en su estructura y muy difícil de detectar, son hidrolizables químicamente o por enzimas y cuentan con un núcleo glucídico. Los taninos condensados son los más comunes y por lo tanto los más estudiados hasta el momento. Generalmente contienen un peso molecular mayor al de los taninos hidrolizables, se encuentran en muchas plantas, sobre todo en la mayoría de las especies leguminosas forrajeras, su estructura está conformada básicamente por polímeros de hidroxiflavonoles; al contrario de los hidrolizables, estos carecen de un núcleo glucídico (Waghorn 2008, Reed 2010).

Muchas plantas leguminosas tropicales se caracterizan por sus altas concentraciones de taninos condensados (TC), los cuales tienen afinidad por las proteínas, carbohidratos y otros constituyentes de las plantas, afectando notablemente la digestibilidad de los nutrimentos, cuando se utilizan dosis elevadas (Waghorn 2008, Patra y Saxena 2009). Algo que no se ha estudiado a profundidad, pero se sabe que concentraciones entre 60 y 100 gkg⁻¹ de materia seca puede ser perjudicial para la digestión (Barry y Duncan 1984). Un efecto relevante es la disminución de degradación de la proteína en el rumen, lo que conlleva dos resultados: una posterior oportunidad de aprovechamiento en el intestino delgado o bien cambio en la vía de excreción del N, disminuyendo en la orina y aumentando en las heces (Flores *et al.* 1999). Debido a su amplia distribución en las plantas, estos compuestos polifenólicos (taninos) se encuentran a menudo en la dieta de los herbívoros. Los dos principales grupos polifenólicos, además de la lignina, son los taninos condensados y los hidrolizables, los cuales pueden causar efectos tóxicos y antinutricionales (Vitti *et al.* 2005, McSweeney *et al.* 2001). Por otro lado, se indica que esta misma capacidad para reaccionar con macromoléculas y proteínas solubles de forrajes durante el paso a través del rumen podría contribuir a la reducción emisiones de N₂O en la ganadería (Pérez-Maldonado 1996, Bueno *et al.* 2008, Kariuki y Norton 2008).

La determinación de taninos condensados se realiza con métodos muy sencillos y de fácil aplicación para la determinación de concentraciones por espectroscopia, como el método de la vainillina (Naczki y Shahidi 2004). Sin embargo, para los taninos hidrolizables la detección y cuantificación es más compleja. La estructura química de estos polifenoles puede ser muy diversa, lo que complica la tarea de identificación de los mismos. Los taninos condensados son los que más han sido estudiados por lo que se puede reportar mayor actividad biológica de estos en la naturaleza (Beecher 2003, Vázquez *et al.* 2012). Esta atracción entre taninos y proteínas se da básicamente porque la molécula del tanino presenta grandes cantidades de grupos fenólicos que proveen numerosos puntos para la formación de enlaces con los grupos carbonilo de los péptidos (Hagerman *et al.* 1992). Dicho enlace está determinado por los taninos, estructura, grado de polimerización, concentración, peso molecular de la proteína y del tanino (Hagerman *et al.* 1992).

Por otro lado, existen otros factores que influyen en la formación de enlaces proteína-tanino, como el pH y otros compuestos (McSweeney *et al.* 2001, Reed 2010). Se sugieren cuatro tipos de enlaces tanino-proteína (Kumar y Singh 1984): puentes de hidrogeno, entre los radicales hidroxilo de los grupos fenólicos y el oxígeno del grupo carbonilo y amido del enlace peptídico de las proteínas. Puentes de hidrógenos (reversibles e independientes del pH) entre el anillo aromático del compuesto fenólico y las regiones hidrofóbicas de la proteína.

Enlaces iónicos (reversibles) entre el ion fenolato y el catión de la proteína; este último enlace se da en los taninos hidrolizables. Enlaces covalentes (irreversibles) formados por la oxidación de los polifenoles a quinonas y la subsiguiente condensación con el grupo nucleofílico de la proteína (Adamczyk *et al.* 2017).

Las saponinas se dividen en esteroides que están compuestos por 27 átomos de carbono y son de gran abundancia en las plantas. Por otro lado, se encuentra los triterpenoides los cuales están formados por 30 átomos de carbono; estas son las saponinas más encontradas en las plantas (Thakur *et al.* 2011). Estos compuestos son conocidos por sus acciones defaunadoras en el rumen, a través de la invasión de las membranas protozoarias al realizar enlaces con esteroides (Wina *et al.* 2005). Con respecto a su uso en la alimentación ganadera, es poca la información que se encuentra. Sin embargo, se sabe que las saponinas podrían reducir la producción metano en el rumen, sin sacrificar productividad animal (Wang *et al.* 2012), lo cual puede ser considerado como un mejor aprovechamiento energético en la digestión de los alimentos. Por otro lado, se ha visto que la inclusión de saponinas en la alimentación mejora el uso del nitrógeno, al generar mayor paso de las proteínas al duodeno (Hess *et al.* 2004, Hart *et al.* 2008). En cuanto al consumo, se ha reportado que no se ve afectado al incluir saponinas en las raciones. Wang *et al.* (2012) en su estudio con cabras encontraron que la inclusión de saponinas en la dieta mejoró la eficiencia alimenticia. Hu *et al.* (2005) reportaron una reducción en la concentración de amonio en un 8,3% después de la suplementación con este metabolito secundario, a razón de 0,4 g l⁻¹ de saponina en la dieta.

Dentro de un sistema ganadero tropical, los pastos tienen bajos contenidos de proteínas y requieren de la utilización de suplementos proteicos para cubrir los requerimientos de animales en crecimiento o con alto potencial productivo. Por tal razón, en la ganadería se recurre a la utilización de suplementos que cubran los requerimientos de N en la dieta, como la utilización de concentrados proteicos. Sin embargo, además de los altos costos, estos alimentos se caracterizan por una elevada degradación de las proteínas en el rumen, generando excesos y uso ineficiente del N (Bunglavan y Dutta 2013; McSweeney *et al.* 2001). La otra alternativa, de más bajo costo para cubrir con las exigencias de proteína en los bovinos, es el uso de especies forrajeras ricas en proteínas. Sin embargo, esta práctica no necesariamente soluciona el uso ineficiente del N en el rumen (Hristov *et al.* 2013, Rodríguez *et al.* 2014). Una de las propuestas que se recomienda ampliamente entre los expertos es el uso forrajes que además de contar con un alto valor proteico, también cuenten con la capacidad de proteger la proteína de la rápida degradación ruminal, función que se reporta en algunos componentes fotoquímicos considerados antinutricionales como los taninos condensados y otros compuestos (Norton y Ahn 1997, Waghorn 2008, Kariuki y Norton 2008, Bueno *et al.* 2008, Hristov *et al.* 2013). Los taninos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en árboles, arbustos y leguminosas herbáceas (McLeod 1974). Se pueden encontrar principalmente en el trópico en zonas áridas o semiáridas (McSweeney *et al.* 2001). Pero también se pueden encontrar en otras regiones no tropicales (Gilboa *et al.* 2000).

El hecho de que los taninos sean sustancias fotoquímicas, permite que las variaciones en las diferentes especies de plantas también generen amplias variaciones en las características químicas y físicas de los taninos. Lo anterior provoca incertidumbre en el comportamiento de su actividad biológica (Beecher 2003, Waghorn 2008).

Los factores que afectan la presencia de taninos en vegetales pueden ser las condiciones ambientales (Torchio *et al.* 2010), genética o el estado de maduración del fruto o la planta (Bindon y Kenedy 2011), estrés de la planta por nutrientes, luminosidad, lluvia ácida y disturbios (Norton y Ahn 1997).

3.8 Efecto de los compuestos secundarios ganadería

El bajo aprovechamiento de las proteínas en el rumen se debe a que la degradación ocurre muy rápido, sin dar oportunidad a la incorporación de amonio a la proteína microbial (McSweeney *et al.* 2001). De manera que gran parte (alrededor del 90%) del nitrógeno proveniente de la proteína degrada en el rumen pasa a ser desechado en las excretas, un 70% en la orina y un 30% en las heces. Así se depositan diariamente altas cantidades de nitrógeno en suelos de pastoreo. Estos compuestos secundarios presentes en una gran variedad de plantas en altas concentraciones se caracterizan por su capacidad para reaccionar con macromoléculas y proteínas solubles de los alimentos durante el paso a través del rumen (Külling *et al.* 2001, Hess *et al.* 2006, Reed 2010, Vázquez *et al.* 2012), efecto que es considerado como una protección de la proteína, ante el incontrolable ataque microbial en el rumen.

Investigaciones han demostrado que la alimentación con forrajes ricos en compuestos secundarios podría reducir las emisiones de gases de efecto invernadero producidos por las excretas de rumiantes (Hristov *et al.* 2013). Esto se asocia a que diversos estudios han reportado disminución relevante del N en la orina, entre 10 y 50% (Carulla *et al.* 2005, Misselbrook *et al.* 2005, Grainger *et al.* 2009), cuando dichos compuestos intervinieron en la digestión. Aguirre *et al.* (2010) observaron como el suplemento con quebracho cambio la ruta de excreción del N, aumentando en las heces y disminuyendo en la orina, bajo dosis de 0 – 1,8% de la MS, lo que significó una reducción en las emisiones de amoniaco del estiércol depositado al suelo comparado con el control.

Este efecto se debe a la reducción de la degradación ruminal del N bajo dietas ricas en taninos (Hess *et al.* 2006, Külling *et al.* 2001). Los taninos forman complejos estables con las proteínas, con pH ruminal en un rango de 3,5- 7,0, pero se disocian en el abomaso a pH inferior de 3,5 (Getachew *et al.* 2000), lo cual permite un mejor aprovechamiento del nitrógeno dentro del sistema digestivo. Cuando un forraje proteico contiene altos niveles de N fácilmente soluble, permite que en el rumen se formen excesos de N amoniacal (N-NH₃) que no pueden ser aprovechados para la síntesis de proteína bacteriana y debe ser evacuado a través de la orina en forma de urea (McSweeney *et al.* 2001). Wiegand *et al.* (1995) observaron que después de dos horas de que los animales se suplementaran con taninos, fue evidente la reducción de 34 a 20 mg 100ml⁻¹ de N-NH₃ en el licor ruminal. Por esta razón, cuando en la dieta se presentan altos niveles de N fácilmente degradable en la orina se evacua hasta un 80% del N excretado, lo cual tiene repercusiones ambientales por su fácil volatilización y diferentes pérdidas potenciales de N.

Los taninos condensados en la dieta atrapan parte de la proteína, la cual no fue degradada en el rumen, pero que en el intestino delgado es sometida a hidrólisis enzimática para ser absorbida (-Min *et al.* 2005). Algunas investigaciones han demostrado este comportamiento de los TC y además se cree que la interacción de los taninos en el sistema digestivo genera una reducción en el crecimiento bacteriano.

A pesar de la falta de claridad de como ocurre este proceso, algunas investigaciones han demostrado estos cambios morfológicos en las bacterias (Bae *et al.* 1993, McSweeney *et al.* 2001, Min *et al.* 2000). Es decir que las concentraciones altas de taninos en forrajes tienen efectos depresivos en el consumo y digestibilidad de la materia seca y nitrógeno (Kumar y D'Mello 1995).

En la alimentación de rumiantes con dietas de calidad alta ricas en N, la mayoría de las proteínas se degradan rápidamente y se libera un alto porcentaje del mismo; en consecuencia, grandes pérdidas de N se producen (25-35%) en forma de amoníaco (Min *et al.* 2000) que eventualmente podrían pasar al hígado, donde los excesos son trasladados al riñón y excretados en forma de urea en la orina. Es decir que la eficiencia en la dieta tendría un efecto directo en la contaminación del ambiente con excretas ricas en nitrógeno.

Esta particular capacidad de los TC para atrapar las proteínas de las especies arbóreas en el rumen, podría ser aprovechada para reducir su degradación en el rumen de los animales de pastoreo sin reducir la síntesis microbiana de proteína. Si bien es cierto que el uso de especies ricas en taninos como forraje podría permitir una mejor utilización del N traduciéndose en una baja en las emisiones de N₂O, también el exceso de taninos en la dieta tiene efectos negativos en la producción del animal (Flores *et al.* 1999). Es decir que es importante considerar límites en el uso de especies forrajeras ricas en taninos como método ecológico para la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero.

3.9 Comportamiento de la producción por el uso de taninos en las dietas

El efecto de los metabolitos secundarios o la afinidad de los taninos por las proteínas, carbohidratos y otros constituyentes de las plantas pueden causar efectos tóxicos y anti-nutricionales (reducción de la productividad de leche, carne) (Waghorn 2008, Vitti *et al.* 2005, McSweeney *et al.* 2001). Se ha encontrado que dosis arriba de 45 g kg⁻¹ MS en la dieta puede causar efectos negativos en el consumo y desempeño de los animales (Min *et al.* 2003, Barry *et al.* 1986). Flores *et al.* (1999) reportaron que los porcentajes de N en la orina mostraron tendencia decreciente a medida que se incrementó (0, 0,21, 0,43 y 0,5 kg 100kg⁻¹ de PV animal⁻¹ día⁻¹) el consumo de *C. calothyrsus* leguminosa rica en taninos. Sin embargo, el consumo de MS en la dieta disminuyó un 13%. No se tienen datos prolongados, pero probablemente esta reducción de consumo tendría repercusiones en la producción, según lo reportado por Grainger *et al.* (2009), quienes trabajaron con vacas lecheras durante aproximadamente cinco semanas con dos niveles de taninos condensados (163 y 326 g día⁻¹) y reportaron una disminución estadísticamente significativa en la producción absoluta de CH₄ con el tratamiento de taninos, pero no observaron efectos de la producción de CH₄ relacionada con la unidades de leche corregida en grasa y proteína; es decir que se redujeron las emisiones de metano hasta un 30% pero también redujo la producción de leche en un 10%. Estos estudios revelan como el rendimiento de la producción puede ser comprometido (carne, leche y otros) por la falta de información que indique las dietas apropiadas para encontrar un balance entre la producción y contaminación ambiental, como lo analizan Hristov *et al.* (2013).

3.10 *Tithonia diversifolia* como estrategia para mitigar las emisiones de oxido nitroso

Los metabolitos secundarios se encuentran ampliamente distribuidos en diversas plantas con potencial forrajero. Estos brindan beneficios a la actividad ganadera como la regulación de parásitos en el sistema digestivo (Terrill *et al.* 1992, Niezen *et al.* 1995), así como la eficiencia en el uso del N. Pero es importante reconocer que el uso de dichas plantas puede implicar efectos contrarios en la nutrición

animal debido a la gran variabilidad de estos compuestos secundarios, ya que al ser un compuesto biológico, sus propiedades y efectos van a ser dependientes de muchas variables que influyan en el metabolismo de las plantas. Varios autores han relacionado de forma contundente las propiedades de plantas forrajeras con factores climáticos (Herrera *et al.* 2017, Ramírez *et al.* 2011); Sampaio *et al.* (2016), por su parte, encontraron una relación entre factores ambientales y la presencia de metabolitos secundarios en la forrajera *T. diversifolia*. Velez-Terranova *et al.* (2014) concuerdan que el campo de las diversas plantas y sus metabolitos secundarios ha sido poco estudiado. De igual manera Hristov *et al.* (2013), en su sección sobre estrategias para la reducción de emisiones de N₂O en ganadería, mencionan la falta de investigación sobre plantas ricas en metabolitos secundarios y su potencial para la reducción de emisiones, temas que todavía se encuentran en las primeras etapas de estudio.

Con respecto a *T. diversifolia* se ha realizado varias investigaciones aisladas que revelan su potencial para la producción ganadera (Gallego *et al.* 2014, Gallego *et al.* 2017), su potencial para disminuir la producción de metano entérico y el mejoramiento de la digestión de los nutrientes en el rumen. Es una planta que presenta metabolitos secundarios (Galindo *et al.* 2011, Sampaio *et al.* 2016), pero de igual manera se ha visto que es una planta muy variable en su composición, siendo dependiente de diversos factores (Lezcano *et al.* 2012, Mejía-Díaz *et al.* 2017).

Aunque se han evidenciado sus bondades para la producción ganadera, algunos estudios no han reportado reducción de N excretado en la orina. Ramírez-Rivera *et al.* (2010) en su estudio concluyen que *T. diversifolia* podría funcionar como una buena fuente de N cuando el forraje es de baja calidad. Estos autores indican también que la suplementación con un 20% de *Tithonia* en la dieta podría mejorar la retención del N en el sistema; sin embargo, no se evidencia claramente el efecto en la pérdida de nitrógeno a través de la orina debido a que este aumenta al incrementar la ingesta de esta planta. Estos autores argumentan que la suplementación con altas concentraciones de *T. diversifolia* no son adecuadas por la rápida degradabilidad de su proteína, característica que podría aprovecharse si esta forrajera se combina con una fuente de carbohidratos altamente degradables, tal como lo reportaron Pathoummalangsy y Preston (2008). Wambui *et al.* (2006), en su experimento suplementando cabras con *T. diversifolia* evidenciaron una rápida degradación de la proteína en el rumen; estos autores asociaron este resultado a la baja concentración de taninos en dicha forrajera. Ramírez *et al.* (2010), confirman la alta degradabilidad ruminal en los tratamientos con esta planta al 35 y 50% de la materia seca pero, cuando se relaciona el N excretado en la orina con el N ingerido, se observa una clara diferencia en el tratamiento con *Tithonia diversifolia* al 20% (39,16% N ingerido es excretado en la orina) comparado con el control (30%N ingerido es excretado en la orina), lo que deja en evidencia el potencial de esta planta para mejorar la eficiencia en el uso del N.

3.11 Bibliografía

- Acamovic, T; Brooker, JD. 2005. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of the Nutrition Society* 64:403-412.
- Adamczyk, B; Simon, J; Kitunen, V; Adamczyk, S; Smolander, A. 2017. Tannins and Their Complex Interaction with Different Organic Nitrogen Compounds and Enzymes: Old Paradigms versus Recent Advances. *ChemistryOpen* 6: 610 -614
- Annison, EF; Bryden, WL. 1999. Perspectives on ruminant nutrition and metabolism. II. Metabolism in ruminant tissues. *Nutr Res Rev* 12:147-177.
- Barry, TN; Duncan, SJ. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 2. Quantitative digestion of carbohydrates and proteins. *Br. J. Nutr.* 51 (3):485-491.
- Barry, TN; Manley, TR; Duncan, SJ. 1986. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 4. Sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. *Br J Nutr.* 55(1):123-37.
- Barton, L; McLay, CDA; Schipper, LA; Smith, CT. 1999. Annual denitrification rates in agricultural and forest soils: a review. *Aust J Soil Res* 37:1073-93.
- Bateman, E; Baggs, E. 2005 Contributions of nitrification and denitrification to N₂O emissions from soils at different water-filled pore space. *Biol Fertil Soils* 41(6):379-388.
- Beecher GR. 2003. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. *J. Nutr.* 133:3248S-3254S
- Bennett, E; Peterson, G; Gordon, L. 2009. Understanding relationships among multiple ecosystem services. *Ecology Letters* 12:1394-1404.
- Benoit, M; Garnier, J; Billen, G. 2015. Temperature dependence of nitrous oxide production of a luvisolic soil in batch experiments. *Process Biochemistry* 50:79-85.
- Bindon, KA; Kennedy, JA. 2011. Ripening-induced changes in grape skin proanthocyanidins modify their interaction with cell walls. *J Agric Food Chem.* 59(6):2696-707.
- Blagodatskaya, E; Zheng, X; Blagodatsky, S; Wiegler, R; Dannenmann, M; Butterbach-Bahl, K. 2014. Oxygen and substrate availability interactively control the temperature sensitivity of CO₂ and N₂O emission from soil. *Biology and Fertility of Soils* 50:775-783.
- Bock, E; Wagner, M. 2006. Oxidation of Inorganic Nitrogen Compounds as an Energy Source. *Prokaryotes* 2:457-495.

- Boussingault, JB. 1841. De la discussion de la valeur relative des assolements, par les resultats de l'analyse elementaire. *Ann. Chimie Phys* 1:208–246.
- Bouwman, A.F; Van Drecht, G; Van der Hoek, W. 2005. Gloval and Regional Surgace Netrogen Balances in Intensive Agricultural Production Systems for the Period 1970-2030. *Pedosphere* 15(2): 137-155.
- Bouwman, AF; Boumans, LJM; Batjes, NH. 2002. Emissions of N₂O and NO from fertilized fields: Summary of available measurement data. *Global Biogeochemical Cycles* 16(4):1-13.
- Bueno, I; Vitti, D; Louvandini, H; Abdalla, A. 2008. A new approach for in vitro bioassay to measure tannin biological effects based on a gas production technique. *Animal Feed Science and Technology* 141:153-170.
- Bunglavan, SJ; Dutta, N. 2013. Use of Tannins as Organic Protectants of Proteins in Digestion of Ruminants *J. of Livestock Sci.* 4:67-77.
- Carter, MS; 2007. Contribution of nitrification and denitrification to N₂O emissions from urine patches. *Soil Biology and Biochemistry* 39:2091-2102.
- Casciotti, K; Ward, B. 2005. Phylogenetic analysis of nitric oxide reductase gene homologues from aerobic ammonia-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 52:197-205.
- Chacón, A; Jiménez, V; Montenegro, B; Sasa, M; Blanco, S. 2014. Inventario nacional de gases de efecto invendero y absorción de carbono. MINAE (Ministerio de Ambiente y Energía, CR); Instituto Metereológico Nacional (IMN, CR). San José, CR.
- Chadwick, D; Sommerd, S; Thormanb, R; Fangueroe, D; Cardenasa, L; Amonc, B; Misselbrooka, T. 2011. Manure management: Implications for greenhouse gas emissions. *Animal Feed Science and Technology* 166-167:514-531.
- Chadwick, DR; Pain, BF; Brookman, SKE. 2000. Nitrous oxide and methane emissions following application of animal manures to grassland. *J Environ Qual* 29:-277-87.
- Chantigny, MH; Rochette, P; Angers, DA; Bittman, S; Buckley, K; Massé, D; Belanger, G; Eriksen-Hamel, N; Gasser, MO. 2010. Soil nitrous oxide emissions following band-incorporation of fertilizer nitrogen and swine manure. *J. Environ. Qual.* 39:1545-1553.
- Chantigny, MH; Pelster, DE; Perron, M-H; Rochette, P; Angers, DA; Parent, LÉ;, Massé, D; Ziadi, N. 2013. Nitrous oxide emissions from clayey soils amended with paper sludges and biosolids of separated pig slurry. *J. Environ. Qual* 42:30-39.
- Clayton, H; McTaggart, IP; Parker, J; Swan, L; Smith, KA. 1997. Nitrous oxide emissions fro fertilized grassland: a two-year study of the effects of N fertilizer from the environmental conditions. *Biol. Fertil. Soils* 25:252-260.

- Compton, JE; Harrison, JA; Dennis, RL; Greaver, TL; Hill, BH; Jordan, SJ; Walker, H; Campbell, HV. 2011. Ecosystem services altered by human changes in the nitrogen cycle: a new perspective for US decision making. *Ecology Letters* 14:804–815.
- Dalias, P; Anderson, JM; Bottner, P; Coûteaux, MM. 2002. Temperature responses of net nitrogen mineralization and nitrification in conifer forest soils incubated under standard laboratory conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 34:691–701.
- Davidson, EA; David, MB; Galloway, JN; Goodale, CL; Haeuber, R; Harrison, JA; Howarth, RW; Jaynes, DB; Lowrance, RR; Nolan, BT; Peel, JL; Pinder, RW; Porter, E; Snyder, CS; Townsend, AR; Ward, MH. 2012. Excess nitrogen in the U.S. environment: Trends, risks, and solutions. *Ecology* 15:-1-16.
- de Klein, CAM. 2001. An analysis of environmental and economic implications of nil and restricted grazing systems designed to reduce nitrate leaching from New Zealand dairy farms. II. Pasture production and cost/benefit analysis. *N.Z. J. Agric. Res.* 44:217-235.
- de Klein, CAM; Eckard, RJ. 2008. Targeted technologies for nitrous oxide abatement from animal agriculture. *Aust. J. Exp. Agric.* 48:14-20.
- Eckard, RJ; Grainger, C; de Klein, CAM. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livest. Sci.* 130:47-56.
- FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations). 2001. Global estimates of gaseous emissions of NH₃, NO and N₂O from agricultural land. Food and Agriculture Organization of the United Nations, International Fertilizer Industry Association, Rome, Italy. 110 p.
- Firestone MK; EA Davidson. 1989. Microbiological basis for NO and N₂O production and consumption in soils, in Exchange of Trace Gases Between Terrestrial and Ecosystems and the Atmosphere. *In* Andrade, M; Schimel, DOS (eds). Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere: report of the Dahlem workshop on exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere. p 7-21. New York, United States of America, John Wiley.
- Flores, O; Ibrahim, M; Kass, D; Andrade, H. 1999. El efecto de especies leñosas forrajeras sobre la utilización de nitrógeno en bovinos. *Agroforestería en las Americas* 23:42-44.
- Follett, RF; Hatfield, JL. 2001. Nitrogen in the environment: sources, problems, and management. In *Optimizing Nitrogen Management in Food and Energy Production and Environmental Protection: Proceedings of the 2nd International Nitrogen Conference on Science and Policy*. TheScientificWorld 1: 920-926.
- Foley, J; DeFries, R; Asner, G; Barford, C; Bonan, G; Carpenter, S; Chapin, F; Coe, M; Daily, G; Gibbs, H; Helkowski, J; Holloway, T; Howard, E; Kucharik, C; Monfreda, C; Patz, J; Prentice I;

Ramankutty N; Snyder P. 2005. Global Consequences of Land Use. *Science*. 309(5734) 570-574.

Fowler, D; Coyle, M; Skiba, U; Sutton, MA; Cape, JN; Reis, S; Sheppard L; Jenkins A; Grizzetti B; Galloway J; Vitousek P; Leach A; Bouwman A; Butterbach-Bahl K; Dentener F; Stevenson D; Amann M; Voss M. 2013. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 368(1621): 1-13.

Frank, B.; Swensson, C. 2002. Relationship Between Content of Crude Protein in Rations for Dairy Cows and Milk Yield, Concentration of Urea in Milk and Ammonia Emissions. *J. Dairy Sci.* 85:1829–1838.

Galindo, J; González, N; Sosa, A; Ruíz, T; Torres, V; Aldana, A; Díaz, H; Moreira, O; Sarduy, L; Noda A. 2011. Efecto de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (botón de oro) en la población de protozoos y metanógenos ruminales en condiciones in vitro. *Rev. Cub. Cienc. Agríc.* 45-(1):33-37.

Gallego, C; Mahecha, L; Angulo, A. 2017. Producción, calidad de leche y beneficio: costo de suplementar vacas holstein con *Tithonia diversifolia*. *Agron. Mesoam* 28(2):-357-370

Gallego-Castro, LA; Mahecha-Ledesmam, L; Angulo-Arizala, J. 2014. Potencial forrajero de *Tithonia diversifolia* Hemsl. A Gray en la producción de vacas lecheras. *Agron. Mesoam.* 25(2):393-403.

Galloway, JN; Dentener, FJ; Capone, DG; Boyer, EW; Howarth, RW; Seitzinger, SP; Asner, GP; Cleveland, CC; Green, PA; Holland, EA; Karl, DM; Michaels, AF; Porter, JH; Townsend, AR; Vorosmarty, CJ. 2004. Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* 70:-153-226.

Galloway, JN; Leach, AM; Bleeker, A; Erisman, JW. 2016. A chronology of human understanding of the nitrogen cycle. *Philos Trans R Soc B* 368: 1-11

Galloway, JN; Townsend, AR; Erisman, JW; Bekunda, M; Cai, ZC; Freney, JR; Martinelli, LA; Seitzinger, SP; Sutton, MA. 2008. Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320:889–892.

Garbeva, P; Baggs, EM; Prosser; JI. 2007. Phylogeny of nitrite reductase (nirK) and nitric oxide reductase (norB) genes from Nitrosospora species isolated from soil. *FEMS Microbiol Lett* 266 :83-89.

García-Velazquez, L; Gallardo, A. 2017. El ciclo global del nitrógeno. Una visión para el ecólogo terrestre. *Ecosistemas* 1: 4-6.

Getachew, G; Makkar, HPS; Becker, K. 2000. Effect of polyethylene glycol on in vitro degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. *Br. J. Nutr.* 84(1):73-83.

- Gilboa, N; Nir, I; Nitsan, Z; Silanikove, N; Perevolotsky, A. 1995. Effect of polyethylene glycol on feed intake, body weight and digestibility in goats fed tannin-rich leaves. *Hassadeh* 75:72-73.
- Godden, SM; Lissemore, KD; Kelton, DF; Leslie, KE; Walton, JS; Lumsden, JH. 2001. Relationships between milk urea concentrations and nutritional management, production, and economic variables in Ontario dairy herds. *Journal of Dairy Science* 84:1128-1139.
- Grainger, C; Clarke, T; Auldism, MJ; Beauchemin, KA; McGinn, SM; Waghorn, GC; Eckard, RJ. 2009. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 89(2):241-251.
- Hagerman, AE; Robbins, CT; Weerasuriya, Y; Wilson, TC; McArthur, C. 1992. Tannin chemistry in relation to digestión. *J. Range Manage.* 45:57-62.
- Harper, LA; Sharpe, RR; Parkin, TB; De Visscher, A; van Cleemput, O; Byers, FM. 2004. Nitrogen Cycling through Swine Production Systems: Ammonia, Dinitrogen, and Nitrous Oxide Emissions. *J. Environ. Qual.* 33: 1189-1201.
- Hart, KJ; Yáñez-Ruiz, DR; Duval, SM; McEwan, NR; Newbold, CJ. 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology* 147:8-35.
- Herrera, RS; Verdecia, DM; Ramírez, JL; García, M; Cruz, AM. 2017. Relation between some climatic factors and the chemical composition of *Tithonia diversifolia*. *Cuban Journal of Agricultural Science* 51(2):1-9.
- Hess, HD; Beuret, RA; Lotscher, M; Hindrichsen, IK; Machmuller, A; Carulla, JE; Lascano, CE; Kreuzer, M. 2004. Ruminant fermentation, methanogenesis and nitrogen utilization of sheep receiving tropical grass hay-concentrate diets offered with *Sapindus saponaria* fruits and *Cratylia argentea* foliage. *Anim. Sci.* 79(1):177-189.
- Hess, HD; Tiemann, TT; Stürm, ChD; Carulla, JE; Lascano, CE; Kreuzer, M. 2006. Effects of tannins on ruminal degradation and excretory pattern of N and implications for the potential N emission from the manure. *International Congress Series* 1293:339-342.
- Hristov, AN; Oh, J; Lee, C; Meinen, R; Montes, F; Ott, T; Firkins, J; Rotz, A; Dell, C; Adesogan, A; Yang, W; Tricarico, J; Kebreab, E; Waghorn, G; Dijkstra, J; Oosting, S. 2013. Mitigación de las emisiones de gases de efecto invernadero en la producción ganadera - Una revisión de las opciones técnicas para la reducción de las emisiones de gases diferentes al CO₂. Gerber, PJ; Henderson, B; y Makkar, HPS (eds.). Roma, Italia, FAO. 231 p. (Producción y Sanidad Animal FAO Documento No. 177).
- Hu, WL; Liu, JX; Ye, JA; Wu, YM; Guo, YQ. 2005. Effect of tea saponin on rumen fermentation in vitro. *Animal Feed Science and Technology* 120(3-4):333-339.

- Huhtanen, PJ; Nousiainen I; Rinne, M; Kytölä, K; Khalili H. 2008. Utilization and partitioning of dietary nitrogen in dairy cows fed grass silage based diets. *J. Dairy Sci.* (91)9:3589–3599.
- Huhtanen, P; Hristov AN. 2009. A meta-analysis of the effects of dietary protein concentration and degradability on milk protein yield and milk N efficiency in dairy cows. *J. Dairy Sci* (92)7: 3222-3232.
- Hyde, BP; Hawkins, MJ; Fanning, AF; Noonan, D; Ryan, M; O`Toole, P; Carton, OT. 2006. Nitrous oxide emissions from a fertilized and grazed grassland in the South East of Ireland. *Nutr Cycl Agroecosyst* 75: 187-200.
- IPCC (Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático). 2006. Capítulo 10: Emisiones resultantes de la gestión del ganado y del estiércol. *In* Eggleston, S; Buendia, L; Miwa, K; Ngara, T; Tanabe, K (eds.). Directrices del IPCC de 2006 para los inventarios nacionales de gases de efecto invernadero. Volumen 4: Agricultura, silvicultura y otros usos de la tierra. p. 10.1–10.91.
- IPCC (Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático). 2007. *Climate Change 2007: Mitigation. Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* B. Metz, O.R. Davidson, P.R. Bosch, R. Dave, L.A. Meyer (eds). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. 851 p.
- IPCC (International Panel on Climate Change). 2013. Summary for Policymakers. *In: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- IPCC (International Panel on Climate Change). 2014. Cambio climático 2014: Impactos, adaptación y vulnerabilidad – Resumen para responsables de políticas. Contribución del Grupo de trabajo II al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático. Field, C.B., V.R. Barros, D.J. Dokken, K.J. Mach, M.D. Mastrandrea, T.E. Bilir, M. Chatterjee, K.L. Ebi, Y.O. Estrada, R.C. Genova, B. Girma, E.S. Kissel, A.N. Levy, S. MacCracken, P.R. Mastrandrea y L.L. White (eds.). Organización Meteorológica Mundial, Ginebra, Suiza, 34 p.
- Janzen, HH; Beauchemin, KA; Bruinsma, Y; Campbell, CA; Desjardins, RL; Ellert, BH; Smith EG. 2003. The fate of nitrogen in agroecosystems: An illustration using Canadian estimates. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 67:85-102.
- Jayanegara, A; Leiber, F; Kreuzer, M. 2012. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. *Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 96(3): 365–375.

- Kariuki, IW; Norton, BW. 2008. The digestion of dietary protein bound by condensed tannin in the gastro-intestinal tract of sheep. *Animal Feed Science and Technology* 142:-197-209.
- Kareiva, P; Watts, S; McDonald, R; Boucher T. 2007. Domesticated Nature: Shaping Landscapes and Ecosystems for Human Welfare. *Science* 316(5833): 1866-1869.
- Konneke, M; Bernhard, AE; De La Torre, JR. 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437:-543-546.
- Köster, JR; Cárdenas, L; Senbayram, M; Bol, R; Well, R; Butler, M; Mühling, KH; Dittert, K. 2011. Rapid shift from denitrification to nitrification in soil after biogas residue application as indicated by nitrous oxide isotopomers. *Soil Biology and Biochemistry* 43:-1671-1677.
- Kroeze, C; Mosier, A; Bouwman, L. 1999. Closing the global N₂O budget: a retrospective analysis 1500-1994. *Global Biogeochem Cycles* 13:1-8.
- Külling, DR; Menzi, H; Krober, TF; Neftel, A; Sutter, F; Lischer, P; Kreuzer, M. 2001. Emissions of ammonia, nitrous oxide and methane from different types of dairy manure during storage as affected by dietary protein content. *J. Agric. Sci. Camb.* 137:235 -250.
- Kumar, R; Singh, M. 1984. Kumar Tannins: Their adverse role in ruminant nutrition. *J. Agric. Food Chem.* 32(3):447-453.
- Le Roux, X; Poly, F; Currey, P; Commeaux, C; Hai, B; Nicol, GW; Prosser, JI; Schloter, M; Attard, E; Klumpp, K. 2007. Effects of aboveground grazing on coupling among nitrifier activity, abundance and community structure. *The ISME Journal* 2:221-232.
- Lee, C., Hristov, A.N., Cassidy, T. y Heyler, K. 2011. Nitrogen isotope fractionation and origin of ammonia nitrogen volatilized from cattle manure in simulated storage. *Atmosphere* 2(3):256-270.
- Lezcano, Y; Soca, M; Ojeda, F; Roque, E; Fontes, D; Montejo, IL; Santana H; Martínez, J; Cubillas, N. 2012. Caracterización bromatológica de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray en dos etapas de su ciclo fisiológico. *Pastos y Forrajes* 35(3):275-282.
- Li, K; Inubushi, K; Sakamoto, K. 2002. Nitrous oxide concentrations in an Andisol profile and emissions to the atmosphere as influenced by the application of nitrogen fertilizers and manure. *Biol. Fertil. Soils* 35:108-113.
- Linn, DM; Doran, JW. 1984. Effect of water-filled pore space on carbon dioxide and nitrous oxide production in tilled and nontilled soils. *Soil Sci Soc Am J* 6:1267-1272.
- López-Fernández, S; Díez, JA; Hernáiz, P; Arce, A; García-Torres, L; Vallejo, A. 2007. Effects of fertiliser type and the presence or absence of plants on nitrous oxide emissions from irrigated soils. *Nutr Cycl Agroecosyst* 78(3):279-289.

- Luo, J; de Klein, CAM; Ledgard, SF; Saggar, S. 2010. Management options to reduce nitrous oxide emissions from intensively grazed pastures: a review. *Agriculture Ecosystems & Environment* 136(3-4):282-291.
- Luo, Y; Melillo, J; Niu, S; Beier, C; Clark, JS; Classen, AT; Davidson, E; Dukes, JS; Evans, RD; Field, CB; Czimczik, CI; Keller, M; Kimball, BA; Kueppers, L M; Norby, RJ; Pelini, SL; Pendall, E; Rastetter, E; Six, J; Smith, M; Tjoelker, MG; Torn, MS. 2011. Coordinated approaches to quantify long-term ecosystem dynamics in response to global change. *Global Change Biol* 17(2): 843–854.
- Luo, J; Sun, XZ; Pacheco, D; Ledgard, SF; Lindsey, SB; Hoogendoorn, CJ; Wise, B; Watkins, NL; 2015. Nitrous oxide emission factors for urine and dung from sheep fed either fresh forage rape (*Brassica napus*) L. or fresh perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Animal - An International Journal of Animal Bioscience* 9(3): 534-543.
- Maeda, K; Spor, A; Edel-Hermann, V; Heraud, C; Breuil, MC; Bizouard, F; Toyoda, S; Yoshida, N; Steinberg, C; Philippot, L. 2015. N₂O production, a widespread trait in fungi. *Scientific Reports* 5: 9697.
- Maina, I; Abdulrazak, S. Muleke, C; Fujihara, T.2012. Potential nutritive value of various parts of wild sunflower (*Tithonia diversifolia*) as source of feed for ruminants in Kenya. *J. Food Agric. Environ* 2: 632-635.
- McLeod, MN. 1974. Plant tannins - their role in forage quality. *Nutrition Abstract Review* 44:-803-15
- McSweeney, CS; Palmer, B; McNeill, DM; Krause, DO. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 91(1-2):-83-93.
- Mejía-Díaz, E; Mahecha-Ledesma, L; Angulo-Arizala, J. 2017. *Tithonia diversifolia*: especie para ramoneo en sistemas silvopastoriles y métodos para estimar su consumo. *Agron. Mesoam.* 28(1):289-302.
- Messman, MA; Weiss, WP; Erickson, DO. 1992. Effects of nitrogen fertilization and maturity of bromegrass on nitrogen and amino acids utilization by cows. *J Anim Sci* 2: 566-575.
- Medina, M; García D; González, E; Cova L; Morantinos, P.2009. Variables morfo-estructurales y de calidad de la biomasa de *Tithonia diversifolia* en la etapa inicial de crecimiento. *Zootecnia Trop.* 27(2): 121- 134.
- Min, BR; Attwood, GT; McNabb, WC; Molan, AL; Bary, TN. 2005. The effect of condensed tannins from *Lotus corniculatus* on the proteolytic activities and growth of rumen bacteria. *Anim. Feed Sci. Technol.* 121(1–2):45-58.

- Min, BR; Barry, TN; Attwood, GT; McNabb, WC. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages. *Anim Feed Sci Technol* 106(1-4):3-19.
- Min, BR; McNabb, WC; Barry, TN; Peters, JS. 2000. Solubilization and degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (EC 4.1.1.39; Rubisco) protein from white clover (*Trifolium repens*) and *Lotus corniculatus* by rumen microorganisms and the effect of condensed tannins on these processes. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 134:305-317.
- Misselbrook, TH; Powell, JM; Broderick, GA; Grabber, JH. 2005. Dietary manipulation in dairy cattle: laboratory experiments to assess the influence on ammonia emissions. *J. Dairy Sci.* 88:1765-1777.
- Mooshammer, M; Wanek, W; Hämmerle, I; Fuchslueger, L; Hofhansl, F; Knoltsch, A; Schnecker, J; Takriti, M; Watzka, M; Wild, B; Keiblinger, KM; Zechmeister-Boltenstern, S; Richter, A. 2014. Adjustment of microbial nitrogen use efficiency to carbon: nitrogen imbalances regulates soil nitrogen cycling. *Nature Communications* 5:3694.
- Naczka, M; Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054:95-111.
- Naranjo, J; Cuartas, C. 2011. Caracterización nutricional y de la cinética de degradación ruminal de algunos de los recursos forrajeros con potencial para la suplementación de rumiantes en el trópico alto de Colombia. *Rev. CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 1: 9-19.
- Newell, SE; Fawcett, SE; Ward, BB. 2013. Depth distribution of ammonia oxidation rates and ammonia-oxidizer community composition in the Sargasso Sea. *Limnol. Oceanogr* 58(4):1491-1500.
- Niezen, JH; Waghorn, TS; Charleston, WAG; Waghorn, GC. 1995. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. *J. Agric. Sci. Camb.* 125(2):281-289
- Norton, BW; Ahn, JH. 1997. A comparison of fresh and dried *Calliandra calothyrsus* supplements for sheep given a basal diet of barley straw. *Journal of agriculture Science* 129(4):485-494.
- Pathoummalangsy, K; Preston, TR. 2008. Effects of supplementation with rumen fermentable carbohydrate and sources of 'bypass' protein on feed intake, digestibility and N retention in growing goats fed a basal diet of foliage of *Tithonia diversifolia*. *Livestock Research for Rural Development* 20 (supplement). Disponible en <http://www.lrrd.org/lrrd20/supplement/kham20076.htm>
- Patra, AK; Saxena, J. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek* 96(4):363-375.

- Patra, AK; Saxena, J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71:1198–1222
- Pelster, DE; Chantigny, MH; Rochette, P; Angers, DA; Rieux, C; Vanasse A. 2012. Nitrous oxide emissions respond differently to mineral and organic nitrogen sources in contrasting soil types. *J. Environ. Qual.* 41(2):427-435.
- Perez-Maldonado, RA; Norton, BW. 1996. The effects of condensed tannins from *Desmodium intortum* and *Calliandra calothyrsus* on protein and carbohydrate digestion in sheep and goats. *British Journal of Nutrition* 76(4):515-533.
- Petersen, SO. 1999. Nitrous oxide emissions from manure and inorganic fertilizers applied to spring barley. *J. Environ. Qual.* 28(5):1610-1618.
- Philippot, L; Andert, J; Jones, CM; Bru, D; Hallin, S. Importance of denitrifiers lacking the gene encoding the nitrous oxide reductase for N₂O emissions from soil. *Glob Chang Biol* 17(3): 1497-504.
- Philippot, L; Germon, JC. 2005. Contribution of bacteria to initial input and cycling of nitrogen in soils. *In* Buscot, F; Varma, A (eds.). *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Soil Biology. Germany, Springer. p. 159-176.
- Powell, JM; Wattiaux, MA; Broderick, GA. 2011. Short communication: Evaluation of milk urea nitrogen as a management tool to reduce ammonia emissions from dairy farms. *J. Dairy Sci.* 94(9): 4690-4694
- Pretty, J; Sutherland, W; Ashby, J; Auburn J; Baulcombe D; Bell, M; Bentley, J; Bickersteth, S; Brown K; Burke, J; Campbell, H; Chen, K; Crowley, E; Crute, I; Dobbelaere, D; Edwards-Jones G; Funes-Monzote F; Charles H; Godfray J; Griffon M; Gypmantisiri P; Haddad L; Halavatau, S; Herren, H; Holderness M; Izac A-M, Jones M; Koohafkan, P; Lal, R; Lang, T; McNeely J, Mueller, A, Nisbett, N; Noble A; Pingali P; Pinto Y; Rabbinge, R; Ravindranath, N; Rola, A; Roling N, Sage C, Settle W, Sha J. M., Shiming L, Simons T, Smith P, Strzepeck K, Swaine H, Terry E; Tomich TP; Toulmin C; Trigo E; Twomlow S Kees, J; Wilson, J; Pilgrim S. The top 100 questions of importance to the future of global agricultura. *International Journal of Agricultural Sustainability* 8: 219-236.
- Ramírez-Rivera, U; Sangines-García, JR; Escobedo-Mex, JG; Cen-Chuc, F; Rivera-Lorca, JA; Lara-Lara, PE. 2010. Effect of diet inclusion of *Tithonia diversifolia* on feed intake, digestibility and nitrogen balance in tropical sheep. *Agroforestry Systems* 80(2):295-302.
- Ramírez, JL; Herrera, RS; Leonard, I; Cisneros, M; Verdecia, D; Álvarez, Y. 2011. Relation between climatic factors, yield, and quality of *Pennisetum purpureum* cv. Cuba CT-169 in the Cauto Valley, Cuba. *Cuban Journal of Agricultura.l Science* 45(3):293-298.
- Reed, J. 2010. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science* 73(5):1516-1528.

- Reynolds, CK. 1992. Metabolism of nitrogen compounds by ruminal liver. *J Nutr* 122: 850 - 854.
- Rodríguez, R; González, N; Ramírez, A; Gómez, S; Moreira, O; Sarduy, L; Medina, Y. 2014. Taninos de leguminosas arbustivas tropicales: su efecto en la protección de proteínas de harina de soya. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 48(3):247-252
- Robertson, G; Swinton, S. 2005. Reconciling agricultural productivity and environmental integrity: a grand challenge for agriculture. *The ecological society of america* 1: 38-46
- Rohe, L; Anderson, TH; Braker, G; Flessa, H; Giesemann, A; Lewicka-Szczebak, D; Wrage-Mönnig, N; Well, R. 2014. Dual isotope and isotopomer signatures of nitrous oxide from fungal denitrification – a pure culture study. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 28(17): 1893-1903.
- Ruíz, T; Alonso, J; Febles, G; Galindo, J; Savón, L; Chongo, B; Torres, V; Martínez, Y; La O, O; Gutiérrez, D; Crespo, G; Cino, D; Scull, I; González, J. 2016. *Tithonia diversifolia*: I. Estudio integral de diferentes materiales para conocer su potencial de producción de biomasa y calidad nutritiva. *Avances en investigación Agrícola* 20: 63-82.
- Saggar, S; Andrew, R; Tate, K; Hedley, C; Rodda, N; Townsend, A. 2004. Modelling nitrous oxide emissions from New Zealand dairy grazed pastures. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 68(3): 243-255.
- Saggar, S; Jha, N; Deslippe, J; Bolan, NS; Luo, J; Giltrap, DL; Kim, DG; Zaman, M; Tillman, RW. 2012. Denitrification and N₂O:N₂ production in temperate grasslands: Processes, measurements, modelling and mitigating negative impacts. *Science of the Total Environment* 465:173-195.
- Sampaio, BL; Edrada-Ebel, R; Batista, F. 2016. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. *Sci Rep.* 6 (29265):1-11
- Santoro, AE; Buchwald, C; McIlvin, MR; Casciotti, KL. 2011. Isotopic signature of N₂O produced by marine ammonia-oxidizing archaea. *Science* 333(6047):1282-1285.
- Santra, A; Saikia, A; Baruah, KK. 2012. Scope of rumen manipulation using medicinal plants to mitigate methane production. *Journal of Pharmacognosy* 3(2):115-120.
- Skiba, S; Jone, U; Dragosis, J; Drewer, D; Fowler, R; Rees, V; Pappa, L; Cardenas, D; Chadwick, S; Yamulki UK. 2012. UK emissions of the greenhouse gas nitrous oxide *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* 367(1593):1175-1185.
- Smil, V. 2001. *Enriching the Earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the Transformation of World Food Production.* Cambridge, United States of America. 338 p.
- Stanford, G; Dzienia, S; Pol, V; AR. 1975. Effect of Temperature on Denitrification Rate in Soils. *Soil Science Society of America Journal* 39(5): 867–870.

- Steinfeld, H; Gerber, P; Wassenaar, T; Castel, V; Rosales, M; de Haan, C. 2009. La larga sombra del ganado – problemas ambientales y opciones. Roma, Italia, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 464 p.
- Stevens, RJ; Laughlin, RJ. 2001. Cattle slurry affects nitrous oxide and dinitrogen emissions from fertilizer nitrate. *Soil Science Society of America Journal* 65(4):1307–1314.
- Sutka, RL; Adams, G.C; Ostrom, N.E; Ostrom, PH. 2008. Isotopologue fractionation during N₂O production by fungal denitrification. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22(4):3989-3996.
- Sutton, MA; Bleeker, A. 2013. The shape of nitrogen to come. *Nature* 494: 435-437.
- Tavares, P; Pereira, AS; Moura, JJG; Moura, I. 2006. Metalloenzymes of the denitrification pathway. *Journal of Inorganic Biochemistry* 100(12):2087-2100.
- Terrill, TH; Douglas, GB; Foote, AG; Purchas, RW; Wilson, GF; Barry, TN. 1992. Effect of condensed tannins upon body growth, wool growth and rumen metabolism in sheep grazing sulla (*Hedysarum coronarium*) and perennial pasture. *J. Agric. Sci. Camb.* 119(2):265-273.
- Thakur M; Melzig, M; F; Fuchs, H; Weng, A. 2011. Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. *Botanics Targets and Therapy* 1:19-29.
- Thompson, RB; Meisinger, JJ. 2002. Management factors affecting ammonia volatilization from land-applied cattle slurry in the mid-Atlantic USA. *J. Environ. Qual.* 31(4):1329-1338.
- Torchio, F; Cagnasso, E; Gerbi, V; Rolle, L. 2010. Mechanical properties, phenolic composition and extractability indices of Barbera grapes of different soluble solids contents from several growing areas. *Anal. Chim. Acta* 660(1-2):183-189.
- Tubiello F; Salvatore M; Golec, RC; Ferrara, A; Rossi, S; Biancalani, R; Federici, S; Jacobs, H; Flammini, A. 2014. Agricultura, Silvicultura y otros Usos de la Tierra Emisiones por fuentes y absorciones por sumideros. Roma, Italia, FAO. 80 p. (Workin Paper Series ESS/14-02).
- Van Alstyne K; McCarthy III J; Husted C y Kearns L. 1999. Phlorotannin allocation among tissues of northeastern pacific kelps and rockweeds. *J Phycol.* 35(3):483-492.
- van Groenigen, JW; Huygens, D; Boeckx, P; Kuyper, ThW; Lubbers, IM; Rütting, T; Groffman, PM. 2015. The soil N cycle: new insights and key challenges. *Soil.* 1:235-256.
- VandeHaar, MJ; St-Pierre, N. 2006. Major Advances in Nutrition: Relevance to the Sustainability of the Dairy Industry. *J. Dairy Sci.* 89(4):1280-1291.

- Vázquez A; Alvarez E; López J; Wall A; De La Rosa L. 2012. Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia Chihuahua* 6(2):84-93.
- Vélez-Terranova, M; Campos, R; Sánchez-Guerrero, H. 2014. Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 17: 489-499.
- Verdecia, DM; Ramírez, JL; Leonard, I; Álvarez, Y; Bazán, Y; Bodas, R; Andrés, S; Álvarez, J; Giráldez, F; López, S. 2011. Calidad de la *Tithonia diversifolia* en una zona del Valle del Cauto. *Revista electrónica de veterinaria* 12(5): 1695-7504
- Vitousek, PM; Cassman, K; Cleveland, C; Crews, T; Field, CB; Grimm, NB; Howarth, RW; Marino, R; Martinelli, L; Rastetter; EB. Sprent; JI. 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 57(1): 1-45.
- Vitousek, PM; Matson, P. 1985. Disturbance, nitrogen availability, and nitrogen losses in an intensively managed loblolly pine plantation. *Ecology* 66(4):1360-1376.
- Vitti, DMSS; Abdallaa, AL; Buena, ICS; Silva Filhob, JC; Costac, C; Buenod, MS; Nozellaa, EF; Longoa, C; Vieirae, EQ; Cabral Filhoa, SLS; Godoya, PB; Mueller-Harveyf I. 2005. Do all tannins have similar nutritional effects? A comparison of three Brazilian fodder legumes. *Animal Feed Science and Technology* 119(3-4):345-361.
- Waghorn, G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology* 147(1-3):116-139.
- Waghorn, G.C., Clark, H., Taufaa, V. y Cavanagh, A. 2008. Monensin controlled-release capsules for methane mitigation in pasture-fed dairy cows. *Aust. J. Exp. Agr.* 48(2):65-68.
- Walker, CB; De La Torre, JR; Klotz MG, Urakawa, H; Pinel, N; Arp, DJ; Brochier-Armanet, C; Chain, PS; Chan, PP; Gollabgir, A; Hemp, J; Hügler, M; Karr, EA;Könneke, M; Shin, M; Lawton, TJ; Lowe, T; Martens-Habbena, W; Sayavedra-Soto, LA; Lang, D; Sievert, SM; Rosenzweig, AC; Manning, G; Stahl, DA. 2010. Nitrosopumilus maritimus genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(19):8818-8823.
- Wambui, C; Abdulrazak, A; Noordin, Q. 2006. Performance of growing goats fed urea sprayed maize stover and supplemented with graded levels of *Tithonia diversifolia*. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 19(7):992-996.
- Wang, JK; Ye, JA; Liu, JX. 2012. Effects of tea saponins on rumen microbiota, rumen fermentation, methane production and growth performance—A review. *Trop Anim Health Prod.* 44(4):697-706.

- Wiegand, R; Reed, J; Said, A; Ummuna, V. 1995. Proanthocyanidins (condensed tannins) and the use of leaves from *Sesbania sesban* and *Sesbania goetzei* as protein supplements. *Animal Feed Science and Technology* 5(1-4):175-192.
- Wiermann R. 1981. Secondary plant products and tissue differentiation. *In* Stumpf, PK; Conn, EE (eds.). *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise. Volume 7.* New York, United States of America, Academic Press p. 85-116
- Wina, E; Muetzel, S; Hoffman, E; Makkar HPS; Becker, K. 2005. Saponins containing methanol extract of *Sapindus rarak* affect microbial fermentation, microbial activity and microbial community structure in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 121(1-2):159-174.
- World Bank; CIAT; CATIE. 2014. *Climate-Smart Agriculture in Costa Rica. CSA Country Profiles for Latin America Series.* Washington, D.C.: The World Bank Group. Disponible en: <https://ccafs.cgiar.org/publications/climate-smart-agriculture-costarica#>. WAtz4CTcDOs.
- Wrage, N; Velthof, GL; van Beusichem, ML; Oenema, O. 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biol Biochem* 33(12-13): 1723–1732.
- Wrage-Mönniga, N; Horn, MA; Well, R; Müller, C; Velthoff, G; Oenema O. 2018. The role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide revisited. *Soil Biology and Biochemistry* 123: A3-A16.
- Yamazaki, T; Hozuki, T; Arai, K; Toyoda, S; Koba, K; Fujiwara, T; Yoshida, N. 2014. Isotopomeric characterization of nitrous oxide produced by reaction of enzymes extracted from nitrifying and denitrifying bacteria. *Biogeosciences* 11:2679-2689.
- Zhang, F; Li, P; Chen, M; Wu, J; Zhu, N; Wu, P; Chiang, P; Hu, Z. 2015. Effect of operational modes on nitrogen removal and nitrous oxide emission in the process of simultaneous nitrification and denitrification. *Chemical Engineering Journal* 280:549-557.
- Zhu, X; Burger, M; Doane, TA; Horwath, WR. 2013. Ammonia oxidation pathways and nitrifier denitrification are significant sources of N₂O and NO under low oxygen availability. *PNAS* 110(16):6328-6333.

CAPÍTULO II

4. Artículo 1. Uso del botón de oro (*Tithonia diversifolia*) como suplemento alimenticio para la reducción del nitrógeno excretado en la orina de vacas lecheras en Turrialba, Cartago, Costa Rica

Pablo Chacón Góngora, Cristóbal Villanueva Najarro, Diego Tobar, Muhammad Ibrahim, Sergio Abarca

4.1 Resumen

Con la intención de mejorar las dietas en sistemas ganaderos tropicales, se han buscado forrajes que además de contar con un alto valor proteico, cuenten también con la capacidad de balancear las condiciones de la digestión y mejorar así el uso del nitrógeno (N) en el sistema. *Tithonia diversifolia* es una planta nativa del sur de México y Centroamérica, la cual se ha estudiado en los últimos años por su alto potencial en la alimentación eficiente de ganado. Con el objetivo de evaluar el efecto de esta planta en la variación de la ruta de excreción del N en vacas lecheras, se llevó a cabo el presente estudio en un sistema semi-estabulado donde se probaron dietas con diferentes niveles de *T. diversifolia* (0%, 6% y 12% de materia seca en la dieta), a un grupo de 9 vacas, bajo un diseño experimental de cuadrado latino 3X3. Las vacas fueron alimentadas en los dos momentos de ordeño del día, con un sistema de corte y acarreo, cada periodo contó 9 días de adaptación y cuatro días experimentales para sumar un total de 13 días. Después de evaluar los resultados arrojados por los tres periodos, se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de N excretado para heces y orina ($p < 0,05$), con una tendencia a reducir el porcentaje de N excretado en la orina cuando se utilizó *T. diversifolia* en la dieta. El nitrógeno ureico en leche fue significativamente menor cuando las vacas se alimentaron con más cantidad de *T. diversifolia* ($p < 0,05$), no se encontraron diferencias significativas en la producción de leche. Los resultados obtenidos ponen en evidencia el potencial de *Tithonia diversifolia* como un forraje complementario en la dieta de la ganadería tropical.

Palabras clave: MUN, metabolitos secundarios, nitrógeno fecal, nitrógeno urinario.

4.1 Abstrac

With the intention of improving diets in tropical livestock systems, forages have been sought that besides having a high protein value, also have the ability to balance the conditions of digestion and thus improve the use of N in the system. *Tithonia diversifolia* is a plant native to southern Mexico and Central America, which has been studied in recent years for its high potential in efficient livestock feeding. In order to evaluate the effect of *Tithonia diversifolia* on the variation of the route of excretion of N in dairy cows, the present study was carried out in a semi-stable system where diets with different levels of T. diversifolia were tested (0%, 6% and 12% of DM in the diet), to a group of 9 cows, under experimental design of 3X3 Latin square. The cows were fed at the 2 milking moments of the day, with a cutting and hauling system, each period had 9 days of adaptation and 4 experimental days to add a total of 13 days. After evaluating the results of the three periods, significant differences were found in the percentage of N excreted for feces and urine ($p < 0.05$), with a tendency to reduce the percentage of N excreted in the urine when *Tithonia diversifolia* was used in the diet, the urea nitrogen in milk was significantly lower when the cows were fed with more amount of *Tithonia diversifolia* ($p < 0.05$), no significant differences were found in milk production. The results obtained show the potential of *Tithonia diversifolia* as a complementary forage in the diet of tropical livestock.

Key words: feces N, MUN, urinary N, secondary metabolites.

4.2 Introducción

Generalmente los pastos tropicales poseen bajos contenidos de proteínas, así como baja degradabilidad ruminal (Ibrahim *et al.* 2005), lo que hace necesario el uso de suplementos proteicos para cubrir los requerimientos de animales con alto potencial productivo. Esta elevada demanda energética y proteica de un sistema lechero conlleva a utilizar excesivos productos en la dieta de las vacas, los cuales en su mayoría no son producidos en la finca, lo que aumenta los costos de producción del sistema. En general esta dieta de alto rendimiento se caracteriza por una rápida degradación de las proteínas en el rumen, provocando un uso ineficiente de nitrógeno (N) en el rumen y excesos en las excretas (heces y orina), mayormente en la orina (Canh *et al.* 1997; Vander Pol *et al.* 2008) donde este elemento llega en forma mineral, potencialmente perjudicial para el medio ambiente, como las emisiones de óxido nitroso (Bunglavan y Dutta 2013; McSweeney *et al.* 2001).

Para reducir la dependencia de gramíneas y concentrados, se ha propuesto como alternativa el uso de especies arbustivas ricas en proteínas; sin embargo, esta práctica no necesariamente resuelve el problema (Waghorn 2008; Patra 2010, Hristov *et al.* 2013; Rodríguez *et al.* 2014), ya que se ha visto que plantas tropicales con altos contenidos de N poseen considerables cantidades de metabolitos secundarios que podrían comprometer la producción bovina. Por otro lado, se ha propuesto que adecuadas concentraciones de estas forrajeras, ricas en metabolitos secundarios como taninos o saponinas, lejos de provocar un efecto deprimente, podría generar beneficios en la producción bovina (Hess *et al.* 2006, Galindo *et al.* 2011); por ejemplo, la protección de la proteína durante su paso por el rumen, evitando una degradación anticipada (Hess *et al.* 2006, Carulla *et al.* 2005, Misselbrook *et al.* 2005, Aguerre *et al.* 2016). De manera que especies arbustivas, además de su valor proteico, también beneficiarían protegiendo la proteína de su rápida degradación ruminal (Ibrahim *et al.* 2005).

En los últimos años incrementó el interés por *Tithonia diversifolia* (botón de oro) y sus beneficios en la nutrición animal. Esta es una planta originaria de México y América Central (Maina *et al.* 2012), reconocida por su potencial forrajero en sistemas ganaderos tropicales debido a características de fácil establecimiento, resistencia a suelos pobres y a podas frecuentes, altos contenidos de nitrógeno disponible y fósforo, bajos niveles de fibra detergente neutro y fibra detergente ácido (Medina *et al.* 2009, Verdecia *et al.* 2011, Ruíz *et al.* 2016). Varios estudios consideran que *T. diversifolia* presenta bajos contenidos de metabolitos secundarios capaces de producir un efecto adverso en el sistema digestivo (Kaitho *et al.* 1997, Dardón y Durán 2011). Por otro lado, se ha reportado una disminución de la población de bacterias metanogénicas y protozoos al suplementar con *T. diversifolia* (Delgado *et al.* 2012), lo cual se puede asociar a una disminución de la producción de CH₄ en el rumen, causado por los metabolitos secundarios presentes en la forrajera. Así mismo, Rivera *et al.* 2013, encontró *in vitro*, que *T. diversifolia* puede reducir un 43,3% la producción de gases (CH₄), comparado con *Pennisetum clandestinum*, haciendo referencia a la presencia de metabolitos secundarios en dicha forrajera.

Se ha reportado que la suplementación con *T. diversifolia* permite sustituir concentrados sin comprometer la producción (Mahecha *et al.* 2007); sin embargo, la rápida degradación ruminal de la proteína presente en *T. diversifolia* podría aumentar las pérdidas de N en las excretas, cuando se suplementa con altas concentraciones de dicho forraje (Ramírez *et al.* 2010, Tendonkeng *et al.* 2014, Ribeiro *et al.* 2016). Por otro lado, Mahecha *et al.* (2007) encontraron que consumos elevados de *T. diversifolia* (>35% de MS en la dieta), podrían comprometer la producción de leche, efectos que se

han encontrado en varias ocasiones al suplementar dietas con elevadas concentraciones de taninos y saponinas, entre otros (McSweeney *et al.* 2001, Vitti *et al.* 2005, Waghorn 2008). No obstante, el presente estudio considera que una adecuada suplementación con *T. diversifolia* podría significar un buen aporte nutrimental y a la vez aprovechar el contenido de metabolitos secundarios generando una reducción del N urinario, como se ha observado en otros estudios con tratamientos que incluyen un moderado contenido de *T. diversifolia* (Ramírez *et al.* 2010, Ribeiro *et al.* 2016).

4.3 Materiales y métodos

El estudio se realizó en la finca comercial del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) en Turrialba, Costa Rica, ubicado a 9° 54' latitud norte y 83° 41' longitud oeste. El terreno de la finca se encuentra a una altitud aproximada de 600 metros sobre el nivel del mar, temperatura promedio de 22°C, humedad relativa de 90,4% y una precipitación media anual de 2636 mm. Los suelos son de origen aluvial, clasificados como Typic humitropepts, fino hallosytico e isohipertérmico y de textura franco-arcillosa (Aguirre 1971). Según la clasificación de Holdridge (1978) la finca de CATIE se ubica en la zona de vida bosque muy húmedo premontano. El pastoreo se realizó en potreros activos compuestos principalmente por taner *Brachiaria arrecta*.

Diseño experimental. Antes de iniciar el ensayo, se registró el peso de la vaca, la producción de leche diaria y días de lactancia (Cuadro 1). Se utilizaron 9 vacas (peso promedio 484kg ± 81) lactantes (13,58Kg ± 2,21 de leche promedio; Cuadro 1), las cuales fueron divididas en tres grupos a los que se les asignaron aleatoriamente tres dietas tratamiento (Cuadro 2), en un diseño experimental de cuadrado latino 3X3. El diseño contó con tres periodos de 13 días cada uno, de manera que todas las vacas probaron todos los tratamientos. En cada periodo, los primeros 9 días eran para adaptación y los últimos 4 días para el registro de las variables de interés en las vacas en los pastos y forrajes y suplementos alimenticios.

Cuadro 1. Características de las vacas seleccionadas para el ensayo en la finca experimental del CATIE, Turrialba, Costa Rica

Vaca	Peso vivo (kg)	Edad de lactancia (días)	Producción de leche (kg)
1	450	147	13,40
2	474	170	11,37
3	515	152	14,60
4	565	165	12,60
5	565	152	14,76
6	402	124	15,21
7	513	138	14,20
8	402	171	12,03
9	471	135	14,06

Fuente: Sistema de registro de la finca (VAMPP)

Cuadro 2. Formulación de las dietas (tratamientos) según el nivel de *T. diversifolia* del ensayo llevado a cabo en la finca experimental del CATIE, Turrialba, Costa Rica

Ingredientes	% <i>Tithonia diversifolia</i>		
	TC	TTd6	TTd12
Forrajes	47	49	54
- <i>T. diversifolia</i>	0	6	12
- Pasto de corte	8	0	0
- Pasto de piso (<i>Brachiaria arrecta</i>)	39	43	42
Concentrados	53	51	46
- Maíz	37	49	41
- Soya	3	0	0
- Pulpa de cítricos	11	0	0
- Melaza de caña de azúcar	2	2	5

TC: tratamiento control sin *T. diversifolia*; TTd6: Tratamiento 6% de *T. diversifolia*; TTd12: tratamiento 12% *T. diversifolia*.

Cada grupo de vacas recibió aleatoriamente los tratamientos Tc (control, sin *T. diversifolia*), TTd6 (*T. diversifolia* 6% de MS en la dieta), TTd12 (*T. diversifolia* 12% de MS en la dieta). Los ingredientes utilizados en Tc fueron los recomendados para simular una dieta promedio en la región que normalmente corresponde a fincas de producción de leche en bajura, los TTd6 y TTd12 contenían menos ingredientes para evitar confusión de efectos (Cuadro 2). El nivel de *T. diversifolia* en los tratamientos se definió antes de iniciar el ensayo, con base en una prueba de consumo voluntario, la cual consistió en ofrecer *T. diversifolia* a siete vacas durante una semana, registrando consumos máximos de 6,5 kg MS por ración. La composición química de los ingredientes se describe en el Cuadro 3.

Alimentación. Para cumplir con la demanda de botón de oro (BO) del experimento, se seleccionó un lote de la plantación de tres años de edad, establecida en la finca comercial del CATIE, a un espaciamiento aproximado de 3X3 m y en suelos con características pobres. Inicialmente se podaron lotes *T. diversifolia* según los cálculos de material necesario para cubrir la demanda diaria del ensayo. El material podado se colocó entre los surcos para aprovechar la incorporación de nutrientes, además se fertilizó cada lote con urea a razón de 150 kg ha⁻¹. Un primer lote fue podado 15 días antes para monitorear y determinar la edad adecuada de corte. El material utilizado se cortó 65 días después de la poda, considerando por igual tallo y hoja; las características del material se muestran en el Cuadro 3. El pasto de corte utilizado en el ensayo recibió el mismo manejo que la finca da a los lotes en uso, con cortes a los 45 días y fertilización con urea a razón de 50 kg ha⁻¹ corte⁻¹.

Cuadro 3. Características de *T. diversifolia* a los 65 días después de la poda de un lote de la plantación establecida en el CATIE, Turrialba, Costa Rica

Componente bromatológico	Planta completa
Materia seca (%) 105°C	84,40
Proteína cruda (%)	17,00
Fibra detergente ácido (%)	29,00
Fibra detergente neutro (%)	43,40
Lignina (%)	5,70
Polifenoles	23,0 ±3*
Taninos condensados	--
Flavonoides	30,48**

* Concentración en mg equivalentes de ácido gálico g⁻¹ MS, ** mg equivalentes de catequina g⁻¹ MS

Las nueve vacas fueron alimentadas al mismo tiempo, racionando la dieta en dos momentos del día (03:00 y 13:00 horas). Los forrajes (*T. diversifolia* y pasto de corte) fueron cortados y acarreados una vez al día para suministrar las dos raciones diarias; antes de cada ración se picaron a un tamaño de 1,5 cm con picadora mecánica y todos los ingredientes se mezclaron en sacos correspondientes a cada tratamiento-vaca. El tiempo de alimentación fue en promedio de 1,5 horas, incentivando el consumo total de la ración con la melaza correspondiente.

Cuadro 4. Características de *Tithonia diversifolia* a los 65 días

Ingredientes	MS (%)	PB (%)	EM (MJ kg ⁻¹ MS)
Forrajes			
- <i>T. diversifolia</i>	17	17.0	4.0
- Pasto de corte	20	8.0	2.0
- Pasto de piso*	18	12.0	10.0
Concentrados			
- Maíz	90	16.5	12.0
- Soya	88	47.8	11.3
- Pulpa de cítricos	87	4.0	9.8
- Melaza caña de azúcar	74	3.0	10.0

MS: materia seca, PB: proteína bruta, EM: energía metabolizable, **Brachiaria arrecta*. Fuente: registros de INTA y análisis propios Laboratorio de Suelos y Tejido Vegetal-CATIE

Muestras. Las muestras de heces y orina se tomaron en los dos últimos días experimentales (una muestra día⁻¹) en los momentos de alimentación (03:00 y 13:00 horas). Las heces se recolectaron directamente del recto induciendo a la vaca a defecar; las muestras (300 gr de heces vaca⁻¹) se trasladaron en frío al laboratorio para ser almacenadas a 4°C. Después de cada periodo las muestras fueron secadas a 55°C durante 72 horas. La orina se recolectó induciendo a la vaca a orinar frotando la zona inferior a la vulva y también directamente de la vejiga urinaria con el uso de pipetas. La muestra de orina (100 ml de orina vaca⁻¹) se trasladó inmediatamente en frío al laboratorio para ser almacenada a 4°C y su inmediata determinación del contenido de N. Para estimar la producción total de heces y orina durante los días experimentales, se utilizaron fórmulas con base a la metodología de Nennich *et al.* (2006).

Durante los cuatro días experimentales (días 11 y 12), se tomaron muestras de los pastos en potreros un día antes del pastoreo para verificar la disponibilidad y calidad, utilizando el método de botanal (Hargreaves y Kerr 1978).

Para verificar la calidad del pasto de corte ofrecido en el tratamiento control se tomaron muestras compuestas (400 gr muestra⁻¹); también se recolectaron muestras compuestas (400 gr muestra⁻¹) de la cantidad de *T. diversifolia* ofrecida.

Se realizaron dos ordeños diarios, a las 3 y 16 horas. En los días 12 y 13 de cada periodo se pesó la leche, utilizando el sistema automatizado de ordeño para estimar su rendimiento. Además, posterior a la limpieza de la ubre, se colectó individualmente muestras de leche para análisis de nitrógeno ureico en leche (MUN, por sus siglas en inglés). Cada una se depositó en bolsas especiales y se mantuvieron en una hielera a 4°C. En el transcurso de las siguientes 30 horas después del muestreo fueron llevadas al laboratorio.

Análisis químicos. En el laboratorio de suelos, tejido vegetal y aguas del CATIE se determinó el N en forrajes y heces por medio del método de combustión total; el N en la orina se determinó con el método de Digestión Kjeldahl y destilación para nitrógeno total. La MS en forrajes y heces se obtuvo secándolos a una temperatura de 70°C hasta alcanzar un peso estable que generalmente fue de 70 horas. El N retenido fue calculado como N ingerido menos N excretado en heces y orina. La determinación de MUN se hizo mediante el método enzimático y la cuantificación por espectrofotometría, usando el equipo ChemSpec®150.

Análisis estadísticos. Los datos fueron analizados como un cuadrado latino de 3X3 con 3 réplicas, utilizando modelos lineales generales y mixtos (InfoStat), los tratamientos como efectos aleatorios y como variables de respuesta MUN en leche, N en orina, N en heces y Kg leche día⁻¹.

El modelo se define como $Y_{ijk} = \mu + W_i + P_j + V_k + \epsilon_{ijk}$, donde Y_{ijk} es la variable de respuesta correspondiente al i -ésimo tiempo, j -ésimo tratamiento y k -ésima vaca. μ es la media general, W_i es el efecto producido por el i -ésimo nivel del factor tiempo. P_j es el efecto producido por el factor tratamiento. V_k es el efecto producido por la k -ésima vaca. ϵ_{ijk} es el error aleatorio independiente.

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Consumo de materia seca

Hubo diferencia significativa ($p < 0,05$) en el consumo de materia seca total (MS) entre el tratamiento control (3.04% del PV) y los tratamientos con *T. diversifolia* TTd6 (2.96% del PV) y TTd12 (3,00% del PV). Estos resultados se atribuyen a que en el diseño de las dietas no se consideró el aumento en el consumo de MS total con *T. diversifolia*; sin embargo, esta diferencia no fue inconveniente para los objetivos de la investigación (Cuadro 5).

A pesar de que se ha evidenciado el consumo de *T. diversifolia* en diversos sistemas ganaderos como lo han reportado algunos autores (Wambui *et al.* 2006; Mahecha *et al.* 2007; Ramírez *et al.* 2010; Ribeiro *et al.* 2016), al inicio de cada periodo hubo variación en la aceptación de los TTd6 y TTd12. Sin embargo, con el avance de los días de adaptación y mezclando con otros ingredientes los consumos se estabilizaron, al igual que lo indican García *et al.* (2008) quienes encontraron que

solamente después de algunos días de adaptación se normalizó el consumo de cabras suplementadas con *T. diversifolia*. Escobar y Carulla (2003) reportaron consumos de materia seca total entre los 12,71 y 23,47 kg día⁻¹. Entre algunos reportes recientes de consumos de vacas lecheras suplementadas con *T. diversifolia*, Ribeiro *et al.* 2016 obtuvieron consumos entre 18,7 y 18,9 kg día⁻¹ suplementando con hoja fresca de *T. diversifolia*. Consumos parecidos reportan Gallego *et al.* (2017) cuando suplementaron vacas lecheras con harina de botón de oro. Se ha reportado que a partir de los 50 días de rebrote, *T. diversifolia* tiende a incrementar su contenido de material fibroso (Verdecia *et al.* 2011; Ferreira 2015). El consumo en el presente estudio pudo estar limitado por la fibra de un material de 60 días, lo que podría reducir el consumo considerablemente por un rápido llenado de rumen (Villalobos y Sánchez 2010). Sin embargo, el consumo reportado se encuentra dentro de los rangos indicados por otros autores (11,94 a 17,41 kg MST día⁻¹).

Cuadro 5. Consumo diario de materia seca (kg MS 100kg⁻¹ de peso vivo) y N (g 100 kg⁻¹ de peso vivo) en vacas alimentadas con tres dietas experimentales en la finca del CATIE, Turrialba, Costa Rica

	Tc	E.E.	TTd6	E.E.	TTd12	E.E.	p valor
MST (kg)	3,04 ^a	0,03	2,96 ^b	0,03	3,00 ^{ab}	0,03	0,0018
MS Concs (kg)	1,41 ^a	0,05	1,33 ^b	0,05	1,15 ^c	0,05	0,0001
MS Td (kg)	0,00 ^c	2,9E-03	0,18 ^b	2,9E-03	0,36 ^a	2,9E-03	0,0001
NIT (g)	66,44 ^a	0,80	66,40 ^a	0,80	66,00 ^a	0,80	0,7327
N Concs (g)	37,80 ^a	1,39	35,11 ^b	1,39	30,43 ^c	1,39	0,0001
N Td (g)	0,00 ^c	0,08	4,92 ^b	0,08	9,78 ^a	0,08	0,0001

TC: tratamiento control, TTd6: tratamiento con 6% de *T. diversifolia*, TTd12: tratamiento con 12% *T. diversifolia*. MST: materia seca total; MS: materia seca; Concs: concentrados consumidos; Td: *Tithonia diversifolia* consumida; NIT: nitrógeno ingerido total; N: nitrógeno; a, b, c: valores con superíndices distintos son significativamente diferentes (prueba LSD de Fisher; P < 0,05)

Tal como se pretendía al diseñar las dietas-tratamiento, hubo diferencias significativas entre los tres tratamientos con respecto a la ingesta de concentrados y *T. diversifolia*. A mayor consumo de *T. diversifolia*, menor consumo de concentrados (p < 0,05) para ambos ingredientes. El porcentaje de *T. diversifolia* consumida con las dietas-tratamiento es parecido a lo reportado por Ribeiro *et al.* (2016) quienes suplementaron vacas lecheras con 6,5 y 15,4% de *T. diversifolia* de la dieta base. Igualmente Mahecha *et al.* (2007), sustituyendo el concentrado por *T. diversifolia*, lograron consumos de 4 y 5,6 kg de forraje verdedía⁻¹animal⁻¹, equivalente a 25 y 35% del suplemento en la dieta.

Las dietas fueron balanceadas hisoproteicamente. A pesar de que hubo diferencias en el consumo de materia seca total (CMST) entre los tratamientos, el N ingerido total muestra en general el comportamiento esperado, donde todos los grupos de vacas consumieron la misma cantidad (N g 100kg⁻¹PV⁻¹) sin diferencias significativas (p > 0,05). En el presente estudio las dietas aportaron 22 gN kgMS⁻¹d⁻¹ en promedio. El contenido de N en las dietas fue similar a lo reportado por otros trabajos como Ribeiro *et al.* (2016) quienes alimentaron vacas lecheras con *T. diversifolia* a una tasa de consumo de N (30 gkgMS⁻¹d⁻¹). Tamminga (1992) indica que vacas lecheras no deberían consumir más de 30 gN kgMS⁻¹d⁻¹.

El N aportado por concentrados fue significativamente mayor en el Tc y decreciente a medida que aumenta la cantidad de *T. diversifolia* en los tratamientos ($p < 0,05$). De igual manera, existen diferencias significativas en el aporte de N por *T. diversifolia* entre los tres tratamientos ($p < 0,05$).

4.4.2 Producción de leche y su contenido de nitrógeno ureico (MUN)

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la producción de leche durante los tres periodos de intercambio de dietas experimentales. En general, la producción de leche para los tratamientos TC, TTd6 y TTd12 se mantuvo en 11,87, 11,74, 11,76 kg vaca⁻¹d⁻¹ respectivamente (Cuadro 6). Esto concuerda con lo reportado por algunos estudios como el de Mahecha *et al.* (2007), quienes con una media de 12,41 kg-leche día⁻¹, no encontraron diferencia en la producción al sustituir concentrado por *T. diversifolia* en la dieta, suplementando vacas lecheras con *T. diversifolia*, resultados parecidos a los de Ribeiro *et al.* (2016) quienes encontraron que la producción de leche se mantuvo durante la suplementación con *T. diversifolia*.

Varias publicaciones han reportado rendimientos, parecidos al comparar dietas suplementadas con *T. diversifolia* (Wambui *et al.* 2006, Mahecha *et al.* 2007, Ramírez-Rivera *et al.* 2015, Ribeiro *et al.* 2016, Gallego *et al.* 2017), atribuyéndolos principalmente a la cantidad y calidad de proteína y contenido de carbohidratos (Medina *et al.* 2009). Además se han encontrado metabolitos secundarios en *T. diversifolia* (Medina *et al.* 2009 y Galindo *et al.* 2011), los cuales podrían favorecer el aprovechamiento de la proteína en el intestino delgado y mejorar eficiencia del N. Todas estas características indican que esta forrajera podría generar un buen balance en la alimentación bovina. Gallego *et al.* (2017), en un experimento suplementaron vacas F1 Holstein de alta producción con harina de *T. diversifolia* hasta un 25% del suplemento, esperando encontrar un aumento en el rendimiento de leche en las vacas con *T. diversifolia*; sin embargo, no se encontraron diferencias entre los tratamientos. Estos autores atribuyen sus resultados a un posible desbalance de nitrógeno amoniacal y energía, refiriéndose al exceso de almidón en este tipo de dietas de producción intensiva. Por otro lado, se ha visto que gran parte de la proteína de esta planta es de rápida degradación, generando condiciones de alto N-amoniacal en el rumen (Wambui *et al.* 2006).

Ramírez-Rivera *et al.* (2010) encontraron un incremento lineal de N urinario cuando suplementaron ovejas con *T. diversifolia* indicando que se debe tener precaución con el uso excesivo de esta forrajera en la dieta debido al alto aporte de proteína fácilmente degradable en el rumen. Viendo esta dificultad, para mejorar el aprovechamiento de las propiedades de *Tithonia diversifolia* Pathoummalangsy y Preston (2008), propusieron aumentar en la dieta el contenido de carbohidratos altamente fermentable que podría permitir la utilización del N disponible en el rumen. Estos investigadores encontraron que al incluir yuca, como fuente de carbohidratos altamente fermentables en la alimentación de cabras a base *T. diversifolia*, el nitrógeno incrementó en las heces y disminuyó en la orina.

Tal como ocurrió en el presente estudio, donde los tratamientos con *T. diversifolia* (TTd6 y TTd12) a diferencia de Tc no contenían soya, posible fuente de proteína altamente degradable. Además, la inclusión de *T. diversifolia* en la dieta significó un buen balance en el rumen por los aportes de fibra y carbohidratos fermentables de esta forrajera; efecto que también se ve reflejado en la concentración de nitrógeno ureico en la leche (MUN, Cuadro 6).

Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura (Gallego *et al.* 2017), con respecto a los beneficios de *T. diversifolia* para la producción y composición de la leche debido a que la inclusión de la dieta podría mejorar el balance entre energía y proteína.

Cuadro 6. Producción media de leche y nitrógeno ureico (MUN) en leche en vacas alimentadas con tres dietas-tratamientos en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica

	TC	TTd6	TTd12	E.E.	P valor
Producción leche (kg)	11,87 ^a	11,74 ^a	11,76 ^a	0,64	0,1158
MUN (mg dl⁻¹)	12,63 ^a	12,26 ^a	10,88 ^a	0,78	0,9685

Tc: tratamiento control, TTd6: tratamiento con 6% de *T. diversifolia*, TTd12: tratamiento con 12% *T. diversifolia*. a, b: valores con superíndices distintos son significativamente diferentes (prueba LSD de Fisher); E.E.: error estándar.

En general, el MUN se mantuvo bajo (12,63, 12,26 y 10,88 mg dl⁻¹) para los tratamientos TC, TTd6 y TTd12 respectivamente (Cuadro 6). Un estudio realizado en varias fincas lecheras de Costa Rica, reportó un MUN promedio de 16,81 mg dl⁻¹ (González y WingChing-Jones 2016), mucho más alto que los resultados del presente estudio. Sin embargo, estos mismos autores hacen la aclaración de que los valores pueden ser altos debido a desequilibrios en las dietas. Cuando se habla de N ureico en leche, en general, se esperan rangos entre 8 a 16 mg dl⁻¹.

En el presente estudio no se encontraron diferencias entre el tratamiento sin *T. diversifolia* y el tratamiento con 6% de *T. diversifolia*, pero si hubo diferencia significativa cuando se incrementó el contenido de *T. diversifolia* en la dieta al 12% (TTd12), pues el contenido de MUN en la leche disminuyó (10,88 mg dl⁻¹, Cuadro 6). Lo contrario ocurrió en el estudio de Gallego *et al.* (2017), quienes encontraron que el MUN en la leche aumentó cuando la vacas fueron suplementadas con harina de *T. diversifolia*, lo cual fue atribuido a dos características de las dietas utilizadas que pudieron haber provocado dicho efecto: un bajo contenido de taninos en el material utilizado (entre 0,08% y 0,11%) y una mala relación proteína energía⁻¹. Ambas características de las dietas pudieron producir excesos de N amoniacal y consecuentemente aumento en el MUN (Lazzarini *et al.* 2009). Se considera que el incremento de MUN en la leche está íntimamente relacionado con excesos de N amoniacal en el rumen, resultando un uso ineficiente del N (Baker *et al.* 1995), efecto que se esperaría cuando se usa *T. diversifolia* en dietas con elevada concentración de proteína debido a la rápida degradación ruminal de esta planta (Medina *et al.* (2009).

Se considera que uno de los factores que influye en la degradación de la proteína en el rumen es el tamaño de las partículas del forraje, de manera que dietas iguales en forrajes y fibra detergente neutro podrían resultar diferentes en su degradación debido al tamaño de picado. Bajo este supuesto, *T. diversifolia* sería más degradable en forma de harina como lo suplementaron Gallego *et al.* (2017) y menos degradable en forma fresca bajo ramoneo o picado, tal como se suministró en el presente trabajo. Esto coincide con lo reportado por Cardona *et al.* (2017) quienes encontraron una disminución en el MUN de vacas bajo un sistema silvopastoril (*T. diversifolia* más kikuyo), comparado con el monocultivo (kikuyo).

4.4.3 Excreción de nitrógeno en heces y orina

No hubo diferencia estadística en la producción media de heces ($p>0,05$), lo que es consistente con el estudio considerando que el experimento se diseñó para que todas las dietas aportaran la misma cantidad de MS. El porcentaje de nitrógeno en las heces se encuentran entre los rangos reportados (León *et al.* 2008). A medida que aumentó el contenido de *T. diversifolia* en la dieta (TC, TTd6 y TTd12), hubo una tendencia a incrementar la cantidad media de N excretado en las heces (2,13, 2,14 y 2,28% respectivamente); sin embargo, solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento TTd12. Normalmente la producción diaria de N en heces se mantiene en 100 a 200 gr; Ribeiro *et al.* (2016), reportaron una excreción media de entre 194 a 201,1 gr N d⁻¹ en heces, lo cual está relacionado con la cantidad de MS consumida. En el presente estudio se encontró una relación positiva entre la cantidad de *T. diversifolia* en la dieta y % N excretado en las heces, donde el tratamiento TTd12 fue significativamente mayor, pero no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de nitrógeno excretado en las heces entre TTd6 y TC, debido a que probablemente la dosis de *T. diversifolia* en el tratamiento TTd6 no fue suficiente para marcar una diferencia con el tratamiento control (TC, Cuadro 2). No se encontró diferencia en los gN día⁻¹ excretado en las heces ($p>0,825$), debido principalmente a que en la estimación de la producción de estiércol, las vacas alimentadas con Tc aumentaron levemente la producción de heces (PH) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Producción y excreción de N en heces de vacas alimentadas con tres dietas--tratamientos en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica

	TC	TTd6	TTd12	E.E.	P valor
PH (Kg d⁻¹)	3,62 ^a	3,60 ^a	3,71 ^a	0,72	0,1158
NH (%)	2,13 ^b	2,14 ^b	2,28 ^a	0,04	0,0090
NH (gr d⁻¹)	79,02 ^{ab}	78,05 ^b	84,95 ^a	2,82	0,0825
NH (gr 100kgPV⁻¹d⁻¹)	16,69 ^a	16,53 ^a	17,91 ^a	1,01	0,1081
NAP (gr vaca⁻¹d⁻¹)	49,76 ^a	49,46 ^a	48,49 ^a	1,48	0,5114
DAN (%)	74,74 ^a	74,74 ^a	72,99 ^a	1,64	0,1481

Tc: tratamiento control, TTd6: tratamiento con 6% de *T. diversifolia*, TTd12: tratamiento con 12% *T. diversifolia*. PH: producción de heces; NH: nitrógeno en heces; NAP (NIT-NH): nitrógeno absorbido aparente; DAN (NAP/NIT): digestibilidad aparente del nitrógeno; a, b: valores con superíndices distintos son significativamente diferentes (prueba LSD de Fisher); E.E.: error estándar.

El porcentaje de nitrógeno excretado en la orina concuerda con lo reportado por algunos autores (León *et al.* 2008, Cardona *et al.* 2017). Aunque no hay una tendencia clara, sí hubo diferencias significativas en la producción de N urinario para TTd12. Se redujo el porcentaje de N (0,60%) cuando las vacas se encontraron bajo el tratamiento con mayor contenido de *T. diversifolia* (TTd12), efecto estadísticamente diferente a los tratamientos TTd6 y Tc. De igual manera, se encontró una relación negativa entre la cantidad de *T. diversifolia* en la dieta y los gramos de N excretado día⁻¹; sin embargo, las diferencias no fueron significativamente diferentes. Otros autores han reportado variaciones en la excreción del N asociado en algunos casos a un efecto de la rápida degradabilidad ruminal de *T. diversifolia* o a la energía aportada por esta planta (Wambui *et al.* 2006; Ramírez-Rivera *et al.* 2010); sin embargo, no se han encontrado resultados contundentes. Tendonkeng *et al.* (2014) en su estudio reportaron que los tratamientos con *T. diversifolia* aumentaron el N excretado,

atribuyendo este resultado a un posible efecto de taninos o compuestos anti-nutricionales presentes en esta forrajera. En el Cuadro 8 se presentan los resultados obtenidos de la producción de orina.

Ciertamente el follaje de *T. diversifolia* es altamente degradable en el rumen (La O *et al.* 2012); sin embargo esto va depender de varias condiciones que podrían optimizar sus beneficios como la edad de la planta (La O *et al.* 2008), su contenido de carbohidratos soluble (Medina *et al.* 2009), sumado a un buen balance de proteína-energía en la dieta (Pathoummalangsy y Preston 2008), entre otros.

Cuadro 8. Producción de orina (l día⁻¹) y N en orina de las vacas alimentadas con tres dietas-tratamientos en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica

	TC	TTd6	TTd12	E.E.	P valor
PO	24,21 ^a	24,00 ^a	23,22 ^b	0,44	0,0040
NO (%)	0,79 ^a	0,71 ^{ab}	0,60 ^b	0,07	0,0200
NO (g d⁻¹)	178,00 ^a	175,89 ^{ab}	139,98 ^b	19,01	0,0682
NO (g d⁻¹100kgPV⁻¹)	36,79 ^a	36,12 ^a	28,81 ^b	3,07	0,0511
NMA (g d⁻¹100kgPV⁻¹)	19,68 ^a	16,87 ^a	12,97 ^a	3,65	0,3175

TC: tratamiento control, TTd6: tratamiento con 6% de *T. diversifolia*, TTd12: tratamiento con 12% *T. diversifolia*. PO: producción de orina; NO: nitrógeno en orina; NMA (NAP-NO): nitrógeno metabolizable aparente; a, b: valores con superíndices distintos son significativamente diferentes (prueba LSD de Fisher); E.E.: error estándar.

Se sabe que existe una relación entre la alta degradación ruminal y la presencia de protozoos en el rumen (Onodera y Kandatsu 1970; Baah *et al.* 2007). La defaunación ruminal se asocia a un mejor aprovechamiento de las proteínas debido a que los protozoos son responsables de suprimir la población bacteriana en el rumen, disminuyendo la posibilidad de producir proteína microbiana que eventualmente pasaría al duodeno. Como resultado se obtiene un aumento en la excreción de N en heces (Eugene *et al.* 2004) y disminución de N en orina (Koenig *et al.* 2000). Se ha evaluado el potencial de *T. diversifolia* para la reducción de metano por su efecto deprimente contra las bacterias metano-génicas y protozoos (Galindo *et al.* 2011, Delgado *et al.* 2012, Mauricio *et al.* 2014, Ribeiro *et al.* 2016), efecto que se podría atribuir a la presencia de polifenoles en sus hojas (Galindo *et al.* 2011, Maina *et al.* 2012, Santacoloma y Granados 2012).

En nuestro estudio se evidenció presencia de polifenoles en *T. diversifolia*, lo que podría explicar la variación en el porcentaje de N excretado en las heces y orina. Cuando Galindo *et al.* (2011) realizaron sus pruebas con *T. diversifolia* encontraron que la reducción de CH₄ puede estar asociado también a la defaunación del rumen por efecto de la suplementación con *T. diversifolia*.

4.5 Conclusiones

- Como lo han reportado otros estudios, en este encontramos que el consumo de *T. diversifolia* puede ser muy bajo al inicio (entre los primeros cinco días), lo que podría limitar el uso de esta planta; sin embargo, también fue claro que este comportamiento dependió mucho del animal.
- La producción de leche de las vacas suplementadas con *T. diversifolia* se mantuvo dentro de los rangos de la finca, lo que sugiere que este arbusto podría ser una alternativa en la suplementación para la producción de leche de bajo costo y uso eficiente del N.
- El comportamiento de las variables MUN, % N en orina y % N en heces demuestra el potencial de *T. diversifolia* para fomentar el uso eficiente de los nutrientes dentro del sistema digestivo en rumiantes.
- La reducción del % N en la orina excretada da indicios de que el uso de este tipo de plantas forrajeras podrían ayudar a la reducción de pérdidas de N en el sistema de pastoreo y con esto también mitigar los daños medio ambientales provocados por la ganadería en la región.

4.6 Recomendaciones

- Es recomendable realizar pruebas de consumo sistematizadas para evaluar la palatabilidad de diferentes variedades de *T. diversifolia*, acompañado de la evaluación de las características nutricionales y como podrían interactuar con el consumo voluntario.
- Evaluar los rendimientos de leche e indicadores financieros en periodos más largos suplementando con *T. diversifolia*, considerando la condición corporal de los animales a lo largo de todo el estudio.
- Hasta el momento se ha reportado importante información sobre el efecto de *T. diversifolia* en la producción de metano entérico. Sin embargo, hace falta un análisis a profundidad del efecto de sus compuestos sobre la población ruminal asociados al uso eficiente de N.

4.1 Bibliografía

- Aguerre, MJ. Capozzolo, C; Lencioni, P; Cabral, C; Wattiaux, MAM. 2016. Effect of quebracho-chestnut tannin extracts at 2 dietary crude protein levels on performance, rumen fermentation, and nitrogen partitioning in dairy cows. American Dairy Science Association 99(6):4476-4486.
- Aguirre A. 1971. Estudio de los suelos del área del Centro Tropical de Investigación y Enseñanza, IICA-Turrialba, C.R. Thesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, IICA. 138 p.
- Baah, J; Ivan, M; Hristov, AN; Koenig, KM; Rode, LM; McAllister, TA. 2007. Effects of potential dietary antiprotozoal supplements on rumen fermentation and digestibility in heifers. Animal Feed Science and Technology 137(1-2):126–137.
- Baker, LD; Ferguson, JD; Chalupa, W. 1995. Responses in Urea and True Protein of Milk to Different Protein Feeding Schemes for Dairy Cows. J Dairy Sc 78(11):2424-2434.
- Bunglavan, SJ; Dutta, N. 2013. Use of Tannins as Organic Protectants of Proteins in Digestion of Ruminants. J. of Livestock Sci. 4:67-77.
- Canh, TT; Verstegen, MWA; Aarnink, AJA; Schrama, JW. 1997. Influence of dietary factors on nitrogen partitioning and composition of urine and feces of fattening pigs. J. Anim. Sci. 75(3):700-706.
- Cardona-Iglesias, JL; Mahecha-Ledesma, L; Angulo-Arizala, J. 2017. Arbustivas forrajeras y ácidos grasos: estrategias para disminuir la producción de metano entérico en bovinos. Agron. Mesoam. 28(1):273-288.
- Carulla, JE; Kreuzer, M; Machmüller, A; Hess, HD. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. Austr. J. Agric. Res. 56(9): 961-970.
- Dardón, V; Durán, M. 2011. Cuantificación espectrofotométrica de taninos y análisis bromatológico proximal de cuatro diferentes mezclas de forrajes a base de gramíneas y leguminosas. Trabajo de graduación Lic. en Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador, Universidad de El Salvador.
- Delgado, DC; Galindo, J; González, R; González, N; Scull, I; Dihigo, L; Cairo, J; Aldama, AI; O. Moreira. 2012. Feeding of tropical trees and shrub foliages as a strategy to reduce ruminal methanogenesis: studies conducted in Cuba. Trop. Anim. Prod. 44(5):1097-1104.
- Escobar, A; Carulla, J. 2003. Efecto de la oferta de forraje sobre los parámetros productivos y composicionales de la leche en la Sabana de Bogotá. Rev. Colom. Cienc. Pecu. 16:74.

- Eugene, M; Archimede, H; Michalet-Doreau, B; Fonty, G; Sauvant, D. 2004. Effects of defaunation on microbial activities in the rumen of rams consuming mixed diet (fresh *Digitaria decumbens* grass and concentrate). *Animal Research* 53(3):187-200.
- Ferreira, LH. 2015. Produtividade e valor nutricional da *Tithonia diversifolia* para ruminantes. Thesis MSc. Minas Gerais, Brasil, Universidade Federal de São João del-Rei.
- Galindo, J; González, N; Sosa, A; Ruíz, T; Torres, V; Aldana, AI; Díaz, H; Moreira, O; Sarduy, L; Noda, AC. 2011. Efecto de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray (Botón de oro) en la población de protozoos y metanógenos ruminales en condiciones *in vitro*. *Rev. Cubana Cienc Agríc* 45(1):33-37.
- Gallego, C; Mahecha, L; Angulo, A. 2017. Producción, calidad de leche y beneficio:costo de suplementar vacas holstein con *Tithonia diversifolia*. *Agron. Mesoam* 28(2):357-370.
- García, D; Medina, M; Clavero, T; Humbría, J; Baldizán, A; Domínguez, C. 2008. Preferencia de árboles forrajeros por cabras en la zona baja de los andes Venezolanos. *Rev. Cient. FCV LUZ* 18(5):549-555.
- González, Blanco; JP WingChing-Jones, R. 2016. Relación del valor de urea en leche con parámetros reproductivos y productivos en vacas Holstein, Jersey y sus cruces. *Cuadernos de Investigación* 8(2):175-183.
- Hargreaves, JNG; Kerr, JD. 1978. Botanal: a comprehensive sampling and computing procedure for estimating pasture yield and composition. II. Computational package. Division of Tropical Crops and Pastures, Tropical Agronomy, CSIRO, Australia. Technical Memorandum Nº. 9. 88 p.
- Hess, HD; Tiemann, TT; Stürm, ChD; Carulla, JE; Lascano, CE; Kreuzer, M. 2006. Effects of tannins on ruminal degradation and excretory pattern of N and implications for the potential N emission from the manure. *International Congress Series* 1293:339-342.
- Holdridge, L. 1978. Ecology based on life zones. Instituto Interamericano de Ciencias Americanas. San Jose, Costa Rica. 206 pp.
- Hristov, AN; Oh, J; Lee, C; Meinen, R; Montes, F; Ott, T; Firkins, J; Rotz, A; Dell, C; Adesogan, A; Yang, W; Tricarico, J; Kebreab, E; Waghorn, G; Dijkstra, J; Oosting, S. 2013. Mitigación de las emisiones de gases de efecto invernadero en la producción ganadera - Una revisión de las opciones técnicas para la reducción de las emisiones de gases diferentes al CO₂. Gerber, PJ; Henderson, B; y Makkar, HPS (eds.). Roma, Italia, FAO. 231 p. (Producción y Sanidad Animal FAO Documento No. 177).
- Ibrahim, M; Villanueva, C; Mora, J. 2005. Traditional and improved silvopastoral systems and their importance in sustainability of livestock farms *In* Silvopastoralism and sustainable land management (2004, Lugo, España). Mosquera-Losada MR (ed.). Proceedings. Wallingford, CABI Publishing. p. 13-18.

- Kaitho, RJ; Umunna, NN; Nsahlai, IV; Tamminga, S; van Bruchem, J; Hanson, J, 1997. Palatability of wilted and dried multipurpose tree species fed to sheep and goats. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 65(1-4):151-163.
- Koenig, KM; Newbold, CJ; McIntosh, FM; Rode, LM. 2000. Effects of protozoa on bacterial nitrogen recycling in the rumen. *Journal of Animal Science* 78(9):2431-2445.
- La O, O; Valenciana, D; Ruíz, TE; Ruíz, O; Castillo, Y; González, H; Rodríguez, C; Hernández, DA; Chongo, B; Arzola, C; Cairo, J. 2008. Efecto de la edad de corte en la capacidad fermentativa *in vitro* y la dinámica de degradación ruminal *in situ* de *Tithonia diversifolia*. *Rev. Zootecnia Tropical* 26(3):243-247.
- La O, O; González, H; Orozco, A; Castillo, Y; Ruiz, O; Estrada, A; Ríos, F; Gutiérrez, E; Bernal, H; Valenciana D; Castro, BI; Hernández, Y. 2012. Composición química, degradabilidad ruminal *in situ* y digestibilidad *in vitro* de ecotipos de *Tithonia diversifolia* de interés para la alimentación de rumiantes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 46(1):47-53.
- Lazzarini, I; Detmann, E; Batista, C; Fonseca, M; de Campos, S; Augusto, M; Albani F. 2009. Intake and digestibility in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. *Rev. Bras. Zootec.* 38(10):2021-2030
- León, JM; Mojica, JE; Castro, E; Cárdenas, EA; Pabón, ML; Carulla, JE. 2008. Balance de nitrógeno y fósforo de vacas lecheras en pastoreo con diferentes ofertas de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) suplementadas con ensilaje de avena (*Avena sativa*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 21:559-570.
- Mahecha, L; Escobar, JP; Suárez, JF; Restrepo LF. 2007. *Tithonia diversifolia* (hemsl.) Gray (botón de oro) como suplemento forrajero de vacas F1 (Holstein por Cebú). *Liv. Res. Rural Dev* 19(2):1-7.
- Maina, I; Abdulrazak, S. Muleke, C; Fujihara, T. 2012. Potential nutritive value of various parts of wild sunflower (*Tithonia diversifolia*) as source of feed for ruminants in Kenya. *J. Food Agric. Environ* 10(2):632-635.
- Mauricio, R., Ribeiro, R; Silveira, S; Silva, P; Calsavara, L; Pereira, L; Paciullo, D; 2014. *Tithonia diversifolia* for ruminant nutrition. *Trop. Grasslands* 2:82-84.
- McSweeney, CS; Palmer, B; McNeill, DM; Krause, DO. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 91(2):83-93.
- Medina, M; García D; González, E; Cova L; Morantinos, P. 2009. Variables morfo-estructurales y de calidad de la biomasa de *Tithonia diversifolia* en la etapa inicial de crecimiento. *Zootecnia Trop.* 27(2):121-134.

- Misselbrook, TH; Powell, JM; Broderick, GA; Grabber, JH. 2005. Dietary manipulation in dairy cattle: laboratory experiments to assess the influence on ammonia emissions. *J. Dairy Sci.* 88(5):1765-1777.
- Nennich TD; Harrison, JH; VanWieringen, LM; St-Pierre, NR; Kincaid, RL; Wattiaux, MA; Davidson, DL; Block, E. 2006. Prediction and Evaluation of Urine and Urinary Nitrogen and Mineral Excretion from Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 89:353–364.
- Onodera, R; Kandatsu, M. 1970. Amino acids and protein metabolism of rumen ciliate protozoa. IV. Metabolism of casein. *Japanese Journal of Zootechnical Science* 41(6):307-313.
- Pathoummalangsy, K; Preston, TR. 2008. Effects of supplementation with rumen fermentable carbohydrate and sources of 'bypass' protein on feed intake, digestibility and N retention in growing goats fed a basal diet of foliage of *Tithonia diversifolia*. *Livestock Research for Rural Development* 20 (supplement). Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd20/supplement/kham20076.htm>.
- Patra, AK. 2010. Meta-analyses of effects of phytochemicals on digestibility and rumen fermentation characteristics associated with methanogenesis. *J. Sci. Food Agric.* 90(15):2700–2708.
- Ramírez-Rivera U, Sangines-García JR, Escobedo-Mex JG, Cen-Chuc F, Rivera-Lorca JA, Lara-Lara PE. 2010. Effect of diet inclusion of *Tithonia diversifolia* on feed intake, digestibility and nitrogen balance in tropical sheep. *Agroforestry Systems* 80(2):295-302.
- Ribeiro, RS; Terry, SA; Sacramento, JP; Silveira, SR; Pereira, CB; da Silva, EF; Mantovani, HC; Sundfeld, MA; Ribeiro, LG; Ribeiro, T; Martins, R; Chaves, AV. 2016. *Tithonia diversifolia* as a Supplementary Feed for Dairy Cows. *PLoSOne* 11(12):1-18.
- Rivera, JE; Cuartas, CA; Naranjo, JF; Tafur, O; Hurtado, EA; Arenas, FA; Chará J; Murgueitio, E. 2015. Efecto de la oferta y el consumo de *Tithonia diversifolia* en un sistema silvopastoril intensivo (SSPi), en la calidad y productividad de leche bovina en el piedemonte Amazónico colombiano. *Livestock Research for Rural Development* 27(10):1-9.
- Rodríguez, R; González, N; Ramírez, A; Gómez, S; Moreira, O; Sarduy, L; Medina, Y. 2014. Taninos de leguminosas arbustivas tropicales: su efecto en la protección de proteínas de harina de soya. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 48(3):247-252.
- Ruíz, T; Alonso, J; Febles, G; Galindo, J; Savón, L; Chongo, B; Torres, V; Martínez, Y; La O, O; Gutiérrez, D; Crespo, G; Cino, D; Scull, I; González, J. 2016. *Tithonia diversifolia*: I. Estudio integral de diferentes materiales para conocer su potencial de producción de biomasa y calidad nutritiva. *Avances en Investigación Agropecuaria* 20(3):63-82.
- Santacoloma, L; Granados, J. 2012. Interrelación entre el contenido de metabolitos secundarios de las especies *Gliricidia sepium* y *Tithonia diversifolia* y algunas propiedades físicoquímicas del suelo. *RIAA* 3(1):53-62.

- Tamminga, S. 1992. Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. *J. Dairy Sci.* 75(1):345–357.
- Tendonkeng, F; Fogang-Zogang, B; Sawa C; Boukila, B; Tedonkeng-Pamo, E. 2014. Inclusion of *Tithonia diversifolia* in multinutrient blocks for West African dwarf goats fed *Brachiaria straw*. *Trop Anim Health Prod* 46(6):981-986.
- Vander Pol, M; Hristov, AN; Zaman, S; Delano, N. 2008. Peas can replace soybean meal and corn grain in dairy cow diets. *J. Dairy Sci.* 91(2):698-703.
- Verdecia, DM; Ramírez, JL; Leonard, I; Álvarez, Y; Bazán, Y; Bodas, R; Andrés, S; Álvarez, J; Giráldez, F; López, S. 2011. Calidad de la *Tithonia diversifolia* en una zona del Valle del Caucho. *Revista electrónica de Veterinaria* 12(5):1695-7504.
- Villalobos, L; Sánchez, JM. 2010. Evaluación agronómica y nutricional del pasto ryegrass perenne tetraploide (*Lolium perenne*) producido en lecherías de las zonas altas de Costa Rica. II .Valor nutricional. *Agron. Costarricense* 34(1):31-42.
- Vitti, DMSS; Abdallaa, AL; Buena, ICS; Silva Filhob, JC; Costac, C; Buenod, MS; Nozellaa, EF; Longoa, C; Vieirae, EQ; Cabral Filhoa, SLS; Godoya, PB; Mueller-Harveyf I. 2005. Do all tannins have similar nutritional effects? A comparison of three Brazilian fodder legumes. *Animal Feed Science and Technology* 119(3-4):345-361.
- Waghorn, G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology* 147(1-3):116–139.
- Wambui, C; Abdulrazak, A; Noordin, Q. 2006. Performance of growing goats fed urea sprayed maize stover and supplemented with graded levels of *Tithonia diversifolia*. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 19(7):992 – 996.

CAPÍTULO III

5. Artículo 2. Estimación de los flujos de óxido nitroso en heces y orina de vacas alimentadas con botón de oro (*Tithonia diversifolia*) en pasturas del trópico bajo de Costa Rica

Pablo Chacón Góngora, Diego Tobar, Cristóbal Villanueva Najarro, Muhammad Ibrahim, Sergio Abarca, Jacobo Arango

5.1 Resumen

Las excreciones de nitrógeno (N) en los sistemas ganaderos con pastoreo parcial o total son especialmente propensos a las emisiones de óxido nitroso (N₂O) después de la deposición de excretas (heces y orina) en el suelo. El uso de plantas forrajeras alternativas que generen un buen balance nutricional en el sistema digestivo, evitando los excesos de N excretado podría traducirse en una reducción de las emisiones de N₂O. En un experimento anterior se probaron dietas con diferentes niveles de *Tithonia diversifolia* y se obtuvo como resultado una reducción en el porcentaje de N excretado en la orina. El objetivo de la presente investigación se enfocó en comparar los flujos de óxido nitroso de excretas depositadas al suelo, provenientes de vacas suplementadas con *T. diversifolia* y vacas suplementadas con concentrados. Para esto fueron aplicados al suelo siete tratamientos con cuatro réplicas en un diseño de bloques completos al azar. Tres tratamientos de heces (T1h, T2h, T3h), correspondientes a vacas con tres gradientes (0%, 6% y 12%) de *T. diversifolia* en la dieta y tres tratamientos de orina (T1o, T2o, T3o), correspondientes a vacas sometidas a los mismo gradientes de *T. diversifolia* en la dieta. Después de tres meses de muestreo se obtuvo una diferencia significativa en los flujos de N₂O entre heces y orina ($p < 0,05$). Sin embargo, los flujos de N₂O entre los tratamientos para heces y orina no presentaron diferencia significativa ($p < 0,5$).

Palabras clave: Botón de oro; óxido nitroso, ganadería, heces y orina.

5.1 Abstract

Due to the large excretions of N, livestock systems with partial or total grazing are especially prone to nitrous oxide emissions after the deposition of excreta (faeces and urine) in the soil. The use of alternative forage plants that generate a good nutritional balance in the digestive system, avoiding the excesses of excreted N could translate into a reduction of N₂O emissions. In a previous experiment, diets with different levels of *T. diversifolia* were tested and a reduction in the percentage of N excreted in the urine resulted. The objective of the present investigation was to compare the nitrous oxide flows of excreta deposited to the soil, from cows supplemented with *Tithonia diversifolia* and cows supplemented with concentrates. For this, 7 treatments with 4 replicas in a randomized complete block design were applied to the floor. 3 faeces treatment (T1h, T2h, T3h), corresponding to cows with three gradients (0%, 6% and 12%) of *T. diversifolia* in the diet. 3 urine treatments (T1o, T2o, T3o), corresponding to cows with three gradients (0%, 6% and 12%) of *T. diversifolia* in the diet. After 3 months of sampling a significant difference was obtained in nitrous oxide fluxes between faeces and urine ($p < 0.05$). However, no significant difference was found between treatments (T1o, T2o, T3o, $p > 0.05$), nor was there difference in nitrous oxide fluxes between faeces treatments ($p > 0.05$).

Key words: Botón de oro, Nitrous oxide, livestock, feces and urine.

5.2 Introducción

En América Latina y el Caribe, la producción bovina aumentó rápidamente en las últimas décadas, principalmente la producción de leche que creció un 35% desde el año 2000. -Costa Rica es uno de los países centroamericanos con mayor crecimiento en la industria lechera (CEPAL *et al.* 2015); es un país donde la actividad ganadera representa un 12% del PIB del sector agropecuario (SEPSA 2014). Por otro lado, el sector ganadero aporta un 28,6% de las emisiones totales de GEI del país, del cual un 36% sería de óxido nitroso (Chacón *et al.* 2014).

Debido a los altos requerimientos de N en sistemas agropecuarios, el uso eficiente de dicho elemento es un tema cada vez más relevante (Compton *et al.* 2011, Hristov *et al.* 2013), como sucede en la ganadería de pastoreo donde ocurren grandes ingresos de N al suelo en forma de excretas (heces y orina) (Luo *et al.* 2008, Schils *et al.* 2013), consecuencia del bajo aprovechamiento de las proteínas en el sistema digestivo de rumiantes (Oenema *et al.* 1997, McSweeney *et al.* 2001). La deposición en el suelo de estas excretas concentradas en N, se traduce en una alta actividad transformadora de este elemento que se convierte en una vía importante de pérdida por N_2O , principalmente por el N procedente de la orina debido a su alta susceptibilidad a la degradación (Saggar *et al.* 2004, Hyde *et al.* 2006, Luo *et al.* 2010, Mazzeto *et al.* 2014). Además, existe incertidumbre con respecto a la variabilidad de las emisiones de N_2O a partir de las excretas en la pasturas, a causa del comportamiento impredecible de los flujos de este gas (Hoben *et al.* 2011, van Groenigen *et al.* 2015), lo que ha llevado a la búsqueda de acciones que ayuden a reducir el escape de N a través de N_2O (Hristov *et al.* 2013).

Siendo el N un elemento importante para la producción de pasturas, en teoría las excretas depositadas al suelo serían un recurso valioso para su fertilización. Sin embargo, una baja eficiencia en el sistema digestivo de rumiantes provoca una mayor excreción de N en la orina, donde este elemento se encuentra en formas altamente susceptibles a la degradación, causando pérdidas relevantes en el suelo como N_2O (Sordi *et al.* 2014, Tully *et al.* 2017).

De manera que reducir la cantidad de nitrógeno excretado en la orina podría significar una alternativa para la reducción de emisiones de N_2O en sistemas de pastoreo (Luo *et al.* 2015). Se ha propuesto que mejorar el uso del nitrógeno dentro del sistema digestivo, a través de la suplementación con forrajes ricos en metabolitos secundarios, podría significar una menor pérdida de N en la orina (Powell *et al.* 2011, Luo *et al.* 2010), aumentando el paso de la proteína hacia el duodeno con dos posibles destinos (Reynolds *et al.* 1992, Annison y Bryden 1999), la absorción de la proteína a través de las paredes del intestino para su respectivo aprovechamiento o bien la excreción a través de las heces donde el N sería menos susceptible a pérdidas en el suelo (Luo *et al.* 2015). Esto último sería de gran

beneficio para el sistema productivo por la capacidad de las heces para degradarse más lentamente a lo largo del tiempo (Külling *et al.* 2001, Hess *et al.* 2006, Luo *et al.* 2015).

En resumen, una suplementación adecuada con plantas forrajeras como *T. diversifolia* permitiría una reducción de N en la orina, acompañada de un posible aumento en las heces. Sin embargo, hace falta conocimiento acerca del efecto de los flujos de N₂O en el suelo, causado por excretas bajas en N después de la suplementación con plantas ricas en metabolitos secundarios. En eses sentido, el presente estudio evalúa el efecto en las emisiones de este gas en las pasturas de una finca en parches de heces y orina excretados por vacas suplementadas con *T. diversifolia*, planta que además de ser conocida por su buen aporte nutricional, contiene modestas cantidades de metabolitos secundarios (Medina *et al.* 2009, Lezcano *et al.* 2012, Gallego *et al.* 2017).

5.3 Materiales y métodos

Localización y características del suelo. El estudio se realizó en la finca comercial del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) en Turrialba, Costa Rica, ubicado a 9° 54' latitud norte y 83° 41' longitud oeste. El terreno de la finca se encuentra a una altitud aproximada de 600 metros sobre el nivel del mar, temperatura promedio de 22°C, humedad relativa de 90,4% y una precipitación media anual de 2636 mm. Los suelos son de origen aluvial, clasificados como Typic humitropepts, fino hallosytico e isohipertérmico, de textura franco-arcillosa (Aguirre 1971). Según la clasificación de Holdridge (1978), la finca de CATIE se ubica en la zona de vida bosque muy húmedo pre-montano. Inicialmente el suelo contenía un 0,77% de N total, 7.66% de C total, una media de 3,70 de N-NH₄⁺ mg kg⁻¹ (min: 1,34 y máx: 8,80) y 10,89 N-NO₃⁻ mg kg⁻¹ (min: 3,55 y máx: 24,93), pH igual a 5, densidad aparente de 0,94 g cm⁻³ (10 cm de profundidad), cobertura regular de pasto estrella (*Cynodon plectostachyus*), el cual fue podado a 10 cm del suelo, el sitio del experimento fue pastoreado por última vez 30 días antes del experimento.

Diseño experimental: En un experimento anterior se alimentaron vacas de la finca comercial de CATIE con tres dietas distintas la cuales correspondieron a: 1) una dieta base de la finca que simulaba una dieta promedio en lechería especializada para pasturas del trópico bajo de Costa Rica; 2) dieta experimental incorporando 6% de *T. diversifolia* como forraje y 3) dieta experimental incorporando 12% de *T. diversifolia* como forraje (Cuadro 9). Las heces y orina de cada vaca se conservaron en frío (4°C) durante dos días.

Cuadro 9. Ingredientes en la alimentación de las vacas utilizadas para la producción de excretas en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica

Ingredientes	Tithonia diversifolia (%)		
	0	6	12
Forrajes	47	49	54
- <i>T. diversifolia</i>	0	6	12
- Pasto de corte	8	0	0
- Pasto de piso (<i>Brachiaria arrecta</i>)	39	43	42
Concentrados	53	51	46
- Maíz	37	49	41
- Soya	3	0	0
- Pulpa de cítricos	11	0	0
- Melaza de caña de azúcar	2	2	5

El día de la deposición al suelo se mezclaron las heces de cada uno de los tres grupos de vacas alimentadas con la dietas descritas en el Cuadro 9, hasta obtener un material homogéneo, el mismo procedimiento se siguió con la orina. De esta forma se obtuvieron tres tratamientos de heces (T1h, T2h, T3h) y tres de orina (T1o, T2o, T3o). El tratamiento T1h corresponde a heces de vacas que no injirieron *T. diversifolia*; sin embargo, no se encontró diferencias significativas en las concentraciones de N, taninos totales y fenoles totales, comparado con los tratamientos de vacas que sí consumieron *T. diversifolia* (Cuadro 10).

Cuadro 10. Descripción de los tratamientos aplicados al suelo durante un ensayo para estimar los flujos de óxido nitroso en heces y orina en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica

Código	Tratamiento**	N (kg ha⁻¹)	C/N	Taninos* (g Kg A. tánico⁻¹)	Fenoles totales* (g Kg A. tánico⁻¹)
T1h	Heces de vacas sin TD	105	19,42	5,93	21,45
T2h	Heces de vacas con 6% TD	106	19,62	6,07	21,43
T3h	Heces de vacas con 12% TD	113	18,31	6,24	21,90
T1o	Orina de vacas sin TD	237	--	--	--
T2o	Orina de vacas con 6% TD	213	--	--	--
T3o	Orina de vacas con 12% TD	180	--	--	--
Tc	Sin aplicación	--	--	--	--

* g ácido tánico kg⁻¹ de materia seca, excretas (heces y orina) de vacas suplementadas con y sin *Tithonia diversifolia*, TD: *Tithonia diversifolia*

Para montar el experimento se delimitó un espacio de 15X20 m en un potrero en uso. Se establecieron cuatro bloques bajo un diseño experimental de bloques completos al azar. En cada bloque se instalaron siete cámaras que correspondían a los tres tratamientos de heces (T1h, T2h, T3h), los tres tratamientos de orina (T1o, T2o, T3o) y una que no recibió aplicación, llamada control (Figura 1). La descripción de los tratamientos aparece en el Cuadro 2.

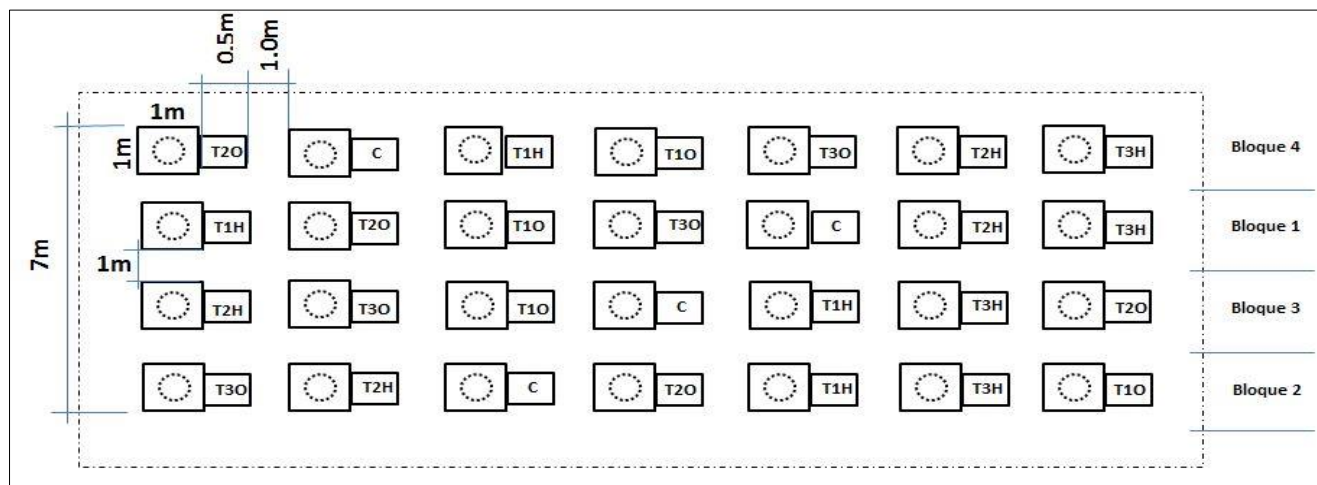


Figura 1. Diseño experimental de ensayo con parches de heces y orina para estimar los flujos de óxido nitroso en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Las heces se aplicaron con la mano, distribuyéndolas uniformemente a un espesor de 2 cm sobre la superficie de cada parcela respectivamente. La orina se aplicó uniformemente sobre las respectivas parcelas a una altura de 1,2 m, simulando la altura promedio de micción de una vaca. La cantidad de N aplicada en cada tratamiento está relacionada con la dieta de las vacas en el experimento 1, donde se obtuvo que el porcentaje de N era mayor en las heces para vacas con mayor consumo de *T. diversifolia*. Por otro lado, en la orina de vacas alimentadas con alta cantidad de *diversifolia* se obtuvo menos %_N (Cuadro 2). Las excretas (heces y orina) recolectadas solo alcanzaron para los bloques 1 y 2, los cuales se denominaron grupo 1 de muestreo, de manera que este proceso se realizó una segunda vez el día 13 de junio de 2018 para depositar las excretas correspondientes a los bloques 3 y 4 (grupo 2 de muestreo).

Para la captura de gases se utilizaron cámaras circulares de flujo cerrado siguiendo las especificaciones propuestas por de Klein y Harvey (2012). Estas cámaras están compuestas por dos partes, la base construida de PVC de alta presión, con radio= 12,5 cm y altura de 8,5 cm y la tapa construida de PVC de alta presión y recubierta de polietileno aluminizado (para evitar cambios drásticos de temperatura), radio= 12,5 cm y una altura de 24 cm. Dos días antes del primer muestreo, las bases de las cámaras fueron insertadas a una profundidad de 5 cm en el suelo.

Flujos de óxido nitroso

Los tratamientos del grupo 1 se aplicaron el 29 de junio de 2017 y los del grupo 2 15 días después (13 de junio de 2018). Después de una hora de la aplicación de los tratamientos al suelo, se inició con la toma de muestras de gases siguiendo la guía metodológica para muestreo de N₂O con cámaras estáticas (de Klein *et al.* 2015).

Se realizaron muestreos frecuente al inicio y menos frecuente al final. De tal manera que la primera semana se muestreó cinco días continuos; la segunda tres días, la tercera dos días y a partir de la cuarta semana se muestreo solo una vez hasta cumplir con los tres meses de toma de datos, lo que equivale a 22 muestreos. Las muestras se tomaron normalmente entre las 8:00 y 11:00 horas. Con la ayuda de una jeringa adaptada a la cámara se extrajo una muestra de 30 ml de gas, la cual fue encapsulada dentro de viales de vidrio de 6 ml y almacenadas en frío hasta su respectivo análisis en el laboratorio de cromatografía. Para todas las cámaras se tomaron tres muestras en tres tiempos distintos (t1, t2 y t3) correspondientes a 0, 20 y 40 minutos después de instalar la tapa en la base. De esta manera se capturó la curva de saturación de gases dentro de la cámara en 40 minutos (de Klein *et al.* 2015).

La precipitación pluvial media se tomó de la estación meteorológica de CATIE, ubicada a 300 m de distancia de la parcela experimental. Cada día de muestreo se tomó la temperatura dentro de la cámara y la ambiental, la humedad relativa y la humedad del suelo.

Análisis químico

Las muestras de suelo, heces y orina fueron llevadas al laboratorio de suelos y tejido vegetal del CATIE. Para determinar las características iniciales del sitio y los tratamientos aplicados se realizó la extracción de nitrato y amonios con KCl 2N y determinación por destilación. El carbono total y el nitrógeno total en el suelo se determinaron por el método de combustión. La determinación de fenoles totales y taninos se realizó de acuerdo a los sugerido por Makkar *et al.* (2003). Las muestras de gases fueron analizadas en el laboratorio del INTA en Ochomogo, Costa Rica, por cromatografía de gases.

5.4 Análisis de los datos

Los cálculos se estimaron con base en la ecuación de flujos (Hutchinson y Mosier 1981).

$$E = (dx/dt) * (VM/AVm)$$

Dónde: E= Flujo de gas N₂O por unidad de área y tiempo. dx/dt= Rango de acumulación del gas en el aire dentro de la cámara expresado en partes por millón por minuto (ppm min⁻¹). V= Volumen del gas expresado en litros. A= Área de la cámara en m². M= Masa de N por cada Mol N₂O, Masa de C por cada mol. Vm= Volumen molecular del gas. El valor de Vm se calcula de la ecuación de gases ideales.

$$Vm = nRT/P$$

Dónde: V_m = Volumen molecular de un gas. n = Moles, R = constante de la ley de los gases ideales (0,0820574587 L atm K⁻¹ mol⁻¹). T = Temperatura dentro de la cámara.

Utilizando el *software* InfoStat se verificó la normalidad de los datos; luego estos fueron analizados por medio de una prueba de comparación de medias LSD de Fisher, utilizando un modelo lineal mixto generalizado donde se declaró el flujo de N₂O (mg N-N₂O m⁻² hr⁻¹) como variable dependiente, días después de la aplicación (DDA) y los bloques se utilizaron como criterios de clasificación; además se consideraron las co-variables humedad del suelo, humedad relativa y temperatura ambiental a lo largo del tiempo.

Las emisiones acumuladas se estimaron utilizando un método de integración trapezoidal y la curva de acumulado se dibujó utilizando la función "acum" sobre los flujos a lo largo del tiempo (Librería R Studio).

El modelo se define como: $Y_{ij} = \mu + T_i + b_j + \varepsilon_{ij}$

Donde Y_{ij} es la respuesta de interés al i -ésimo tratamiento en el j -ésimo bloque, μ la media general de rendimientos, T_i los efectos fijos de los tratamientos, b_j el cambio del nivel medio de Y_{ij} asociado al j -ésimo bloque y ε_{ij} el término de error.

5.5 Resultados y discusión

4.4.4 Variables ambientales y humedad del suelo

La temperatura promedio fue de 24,65°C a lo largo del periodo de muestreo, con temperaturas mínimas de 22°C y máximas de 30°C, no se encontró mucha variación de esta variable (Figura 2). Los eventos de precipitación fueron frecuentes a lo largo de todo el periodo de muestreo con una media semanal de 40 mm; durante los primeros días después de la aplicación de los tratamientos fueron lluviosos, con precipitaciones semanales de 52 y 38,6 mm para los grupos 1 y 2 respectivamente (Figura 2). La humedad del suelo se mantuvo en 52% en los primeros meses del ensayo y en los últimos 30 días el promedio aumentó a 62%. La humedad del suelo y la temperatura se consideran entre las variables ambientales que más influyen en las emisiones de óxido nitroso (Cardoso *et al.* 2017).

Tomando en cuenta estas variables, el estudio se desarrolló bajo condiciones con alta probabilidad de producción de óxido nitroso. Sin embargo, no se pudo encontrar una interacción de las co-variables humedad del suelo y precipitación ($p > 0,05$). La interacción de la co-variable temperatura fue significativa para los flujos de N₂O ($p < 0,05$).

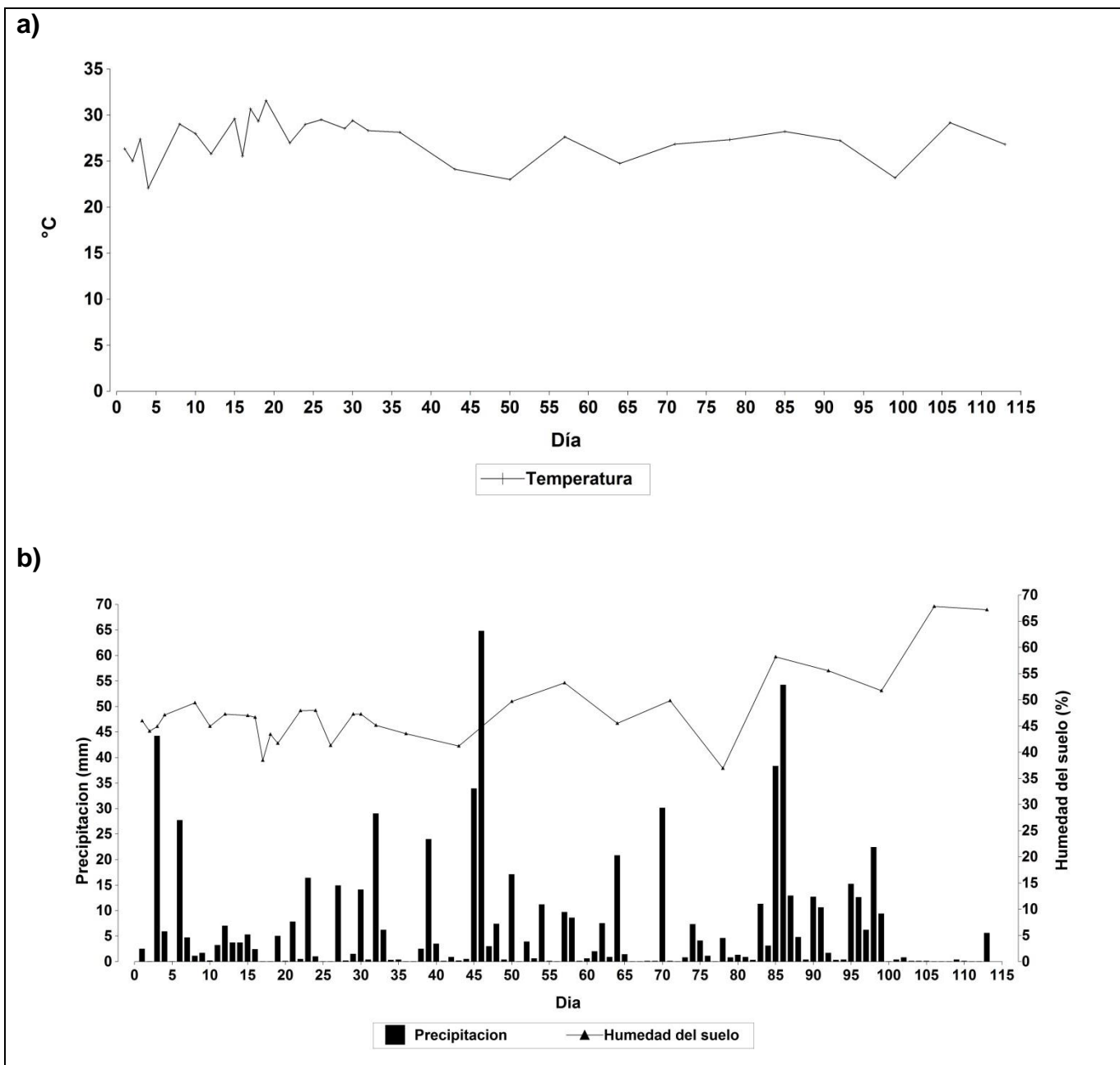


Figura 2. Distribución de la temperatura y precipitación a lo largo del periodo de muestro de óxido nitroso, finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica

En general los flujos de N_2O de los tratamientos de orina fueron significativamente más altos (entre 10 a 25 $mg\ N-N_2O\ m^{-2}\ hr^{-1}$) que los flujos de los tratamientos de heces (1 a 2 $mg\ N-N_2O\ m^{-2}\ hr^{-1}$) con un p-valor ($<0,05$), principalmente durante los primeros días después de la aplicación (DDA, Figura 3). La marcada diferencia entre tratamientos de orina y heces se atribuye, como ya es conocido, a la alta susceptibilidad a la degradación del N urinario dada por las formas en que este se encuentra (Clough *et al.* 2009, Luo *et al.* 2015, Sordi *et al.* 2014). A partir de 10 DDA se ve una rápida reducción en los flujos de N_2O a niveles cercanos a cero, principalmente en los tratamientos de orina. Los flujos en los tratamientos de heces también fueron de menor a mayor en los primeros días sin

generar picos demasiado altos y la liberación se dio de forma más estable en el tiempo. Se podría considerar que la baja cantidad de nitrógeno aplicado en forma de heces pudo influir en el comportamiento de los flujos. El comportamiento de los flujos de N_2O a lo largo del tiempo fue similar a lo que se ha reportado para este tipo de estudios (van Groenigen *et al.* 2005a, 2005b; Lessa *et al.* 2014).

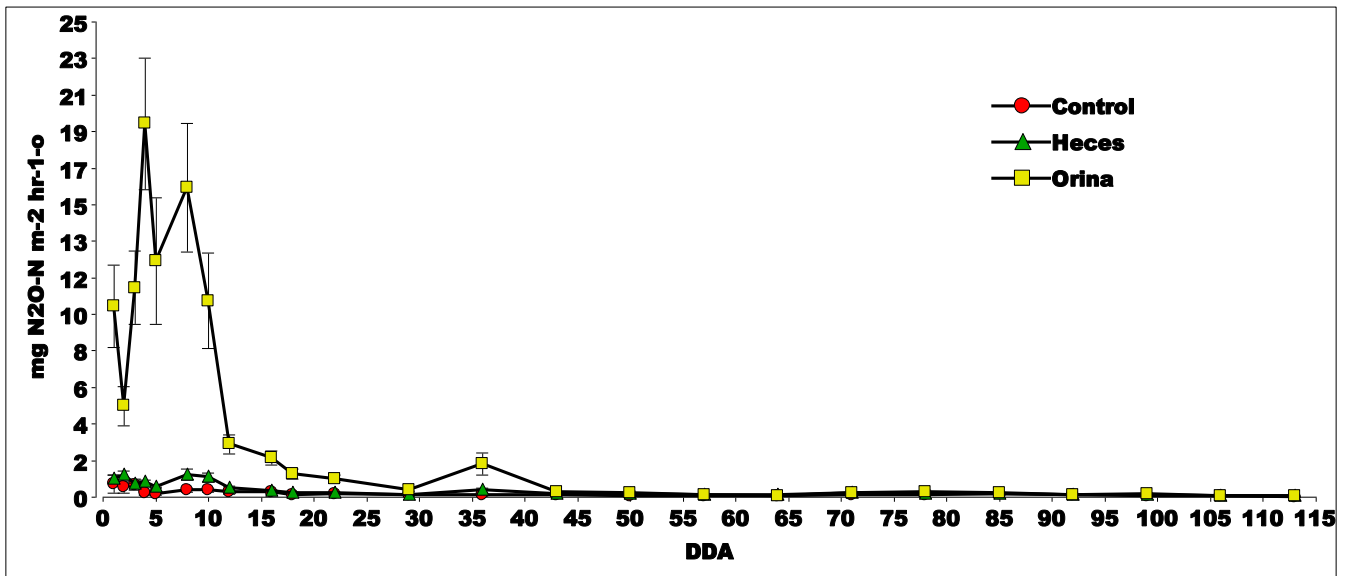


Figura 3. Comparación de los flujos de óxido nitroso de heces y orina ($p < 0,05$) provenientes del ensayo realizado en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica

Cuando se analizaron los datos se encontró que 36 DDA de los tratamientos del grupo 2, hubo picos muy pronunciados en las sub-parcelas (Figura 3). Se puede observar que este pico coincide con un incremento en la precipitación pluvial y la humedad del suelo, lo que podría explicar el comportamiento irregular en las parcelas de este grupo. Es importante considerar que los tratamientos del grupo 2 fueron aplicados 15 días más tarde, lo que podría explicar porque este evento solo se pudo observar en sus parcelas.

Al inicio del periodo de muestreo se encontraron flujos altos de N_2O en las sub-parcelas control (media: $1,10\ mg\ N-N_2O\ m^{-2}\ hr^{-1}$), los cuales decrecieron gradualmente hasta estabilizarse. Este comportamiento se atribuyó a un efecto residual del pastoreo realizado antes de establecer la parcela experimental.

4.4.5 Flujos de óxido nitroso en parches de orina.

Se observa que los flujos de los tratamientos de orina fueron muy elevados y variables en el primer día de muestreo (Figura 4), sin tendencias significativas. Podemos ver que en el grupo 1 se encontró un máximo en T2o (25 mg N-N₂O m⁻² hr⁻¹) y el mínimo en T1o (3,947 mg N-N₂O m⁻² hr⁻¹). En el grupo 2 se observa el máximo en T2o (17 mg N-N₂O m⁻² hr⁻¹) y el mínimo en el T2o (3,82 mg N-N₂O m⁻² hr⁻¹). El 2 DDA se ve una caída en los flujos del grupo 1 con máximos y mínimos de 11,7 y 4,5 mg N-N₂O m⁻² hr⁻¹ respectivamente; 15 días después ocurrió la misma caída en el grupo 2 en el segundo día después de la aplicación de los tratamientos. Lo anterior indica que hubo una variabilidad de los flujos durante el primer día, antes de que pudieran estabilizarse, asociado al evento de la aplicación. A partir del tercer día de aplicados los tratamientos se observa que los flujos tienden a incrementar con menos variabilidad entre los tratamientos. La mayor cantidad de picos altos se dieron entre los 3 y 20 DDA siendo los más altos entre los 4 y 10 DDA (Figura 4), comportamiento típico de los flujos de N₂O después de la aplicación de N, encontrado por otros autores (Galbally *et al.* 2010, Lessa *et al.* 2014; Cardoso *et al.* 2017). 22 DDA los flujos disminuyeron considerablemente hasta una media de 0,46 mg N-N₂O m⁻² hr⁻¹. Para ambos grupos no se encontró un efecto de los tratamientos T1o, T2o y T3o en los flujos de N₂O en la orina ($p > 0,05$).

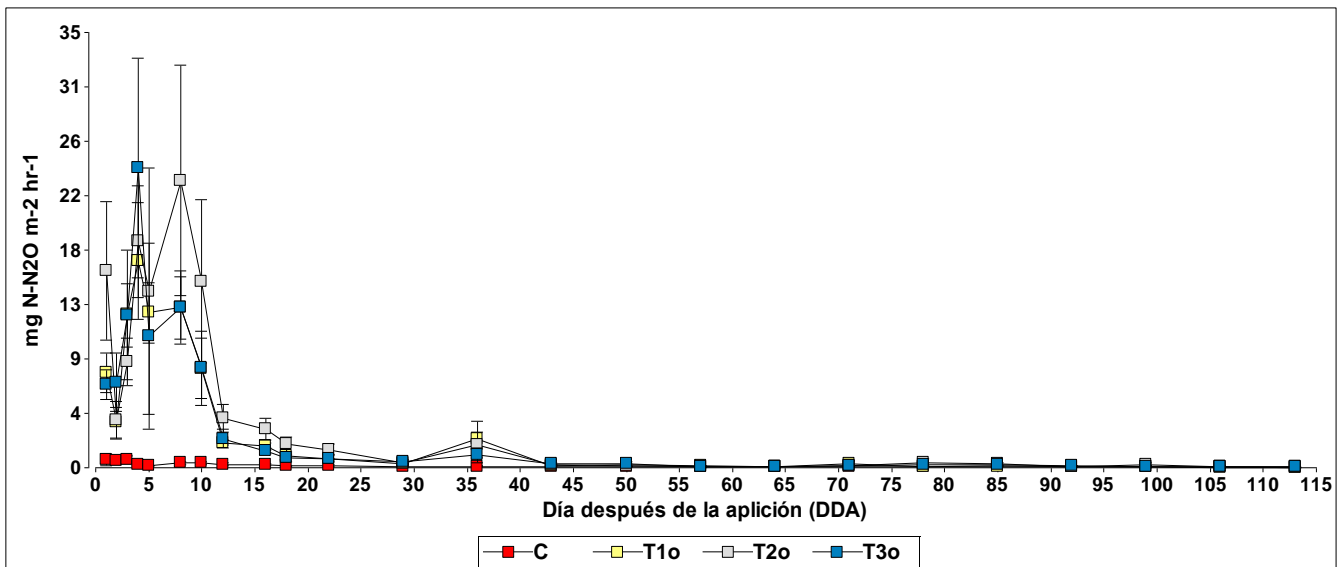


Figura 4. Flujos de óxido nitroso en parches de orina de los grupos 1 y 2 a lo largo de 113 días después de la aplicación de los tratamientos correspondientes al ensayo realizado en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Los flujos altos encontrados en este estudio para los parches de orina (28,19 mg N-N₂O m⁻² hr⁻¹), son mucho más elevados de lo que normalmente se ha reportado (Mazzetto *et al.* 2014, Byrnes *et al.* 2017, Tully *et al.* 2017). Sordi *et al.* (2014) en su estudio realizado en el sub-trópico sub-húmedo, obtuvieron los mayores picos (3,19 mg N-N₂O m⁻² hr⁻¹) alrededor de los 12 DDA. De igual forma, Barneze *et al.* (2014) encontraron que los picos más elevados (1,25 y 0,86 mg N-N₂O m⁻² hr⁻¹) fueron

los días 3 y 13 después de la aplicación. Por otro lado, se han reportado flujos de N_2O más altos; por ejemplo, Luo *et al.* (2008) en un estudio en Nueva Zelanda obtuvieron picos arriba de $6 \text{ mg N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ hr}^{-1}$; estos autores asociaron estos picos a valores elevados de humedad en el suelo (65%). Bertram *et al.* (2010) en su estudio para probar diferentes dosis de N_2O en la orina, no encontraron un efecto del inhibidor; sin embargo, pudieron observar que los flujos de N_2O aumentaron considerablemente desde $0,31 \text{ mg N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ hr}^{-1}$ cuando la temperatura era de 5°C hasta $>11 \text{ mg N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ hr}^{-1}$ cuando la temperatura aumentó a 20°C . Se ha sugerido que en condiciones del trópico, los flujos de N_2O podrían aumentar debido a que mayor humedad (Cardoso *et al.* 2017) y temperatura favorecen la actividad microbológica (Bertram *et al.* 2009). Lessa *et al.* 2014 realizaron dos experimentos para evaluar las emisiones de N_2O en parches de orina. En el primer experimento encontraron picos arriba de $12 \text{ mg N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ hr}^{-1}$, con una humedad del suelo mayor a 60%; sin embargo, en el segundo experimento los flujos de N_2O bajaron considerablemente, lo que coincidió con una reducción en la humedad del suelo. Estos autores también resaltaron que la razón por la cual sus resultados presentaban flujos tan elevados comparados con otros estudios hechos en Brasil, podría ser la temperatura. En el presente estudio, la humedad promedio fue $>55\%$, combinado con una temperatura promedio $>22^\circ\text{C}$ y N urinario potencialmente disponible que podría causar un efecto directo en los flujos de N_2O (Smith *et al.* 2003; Luo *et al.* 2008; Luo *et al.* 2015). Sin embargo, cuando se verificó la covarianza de los flujos con las variables ambientales, se encontró una interacción con la temperatura del aire ($p < 0,05$) (Figura5), pero no hubo interacción con la humedad del suelo ($p > 0,05$) y la precipitación pluvial ($p > 0,05$).

Se sabe que el proceso de desnitrificación es el mayor productor de N_2O en el suelo, proceso que depende principalmente de la disponibilidad de NO_3^- y una adecuada humedad que genere un ambiente anaeróbico. Condiciones típicas de un sistema de pastoreo en el trópico, como las condiciones de la parcela experimental del presente estudio, donde inicialmente el suelo contaba con altas concentraciones de nitratos $10.89 \text{ N-NO}_3^- \text{ mg kg}^{-1}$ (min: 3.55 y máx.: 24.93) y aunque la humedad del suelo promedio fue menor a 60%, eventualmente esta variable incrementó. De manera que no se descarta una gran participación de la humedad del suelo en los resultados obtenidos.

De igual manera, se ha encontrado que la compactación del suelo podría provocar mayor emisión de N_2O , debido un suelo con estas condiciones es más propenso a la saturación de poco espacio poroso, generando condiciones anaeróbicas ideales para la desnitrificación. La densidad aparente promedio del suelo para el presente estudio se encuentra en un rango medio alto (0.94 gr cm^{-3}) lo que asociado a eventos de precipitación podría traducirse en emisiones N_2O . van Groenigen *et al.* (2005a)

encontraron una relación positiva entre la compactación del suelo y las emisiones de N_2O , de igual manera Cardorso *et al.* (2017) encontraron un efecto de la compactación del suelo en el aumento de las emisiones de N_2O , en ambas publicaciones indican que este efecto estaría ligado a la humedad del suelo.

4.4.6 Flujos de óxido nitroso en heces.

No se encontró diferencia significativa en los flujos de óxido nitroso en los tratamientos T1h, T2h y T3h ($p>0.05$), los cuales mostraron la misma tendencia entre ellos, con flujos de óxido nitroso mucho más estables que el comportamiento de los flujos de orina. Para ambos grupos 1 y 2 se encontraron los picos más altos en los primeros 18 días después de la aplicación, con valores máximos mayores a $2 \text{ mg N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ hr}^{-1}$ y cierta tendencia a disminuir, durante los siguientes muestreos no se encontraron picos relevantes de N_2O , los cuales se mantuvieron $<0,5 \text{ mg N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ hr}^{-1}$ (Figura 5).

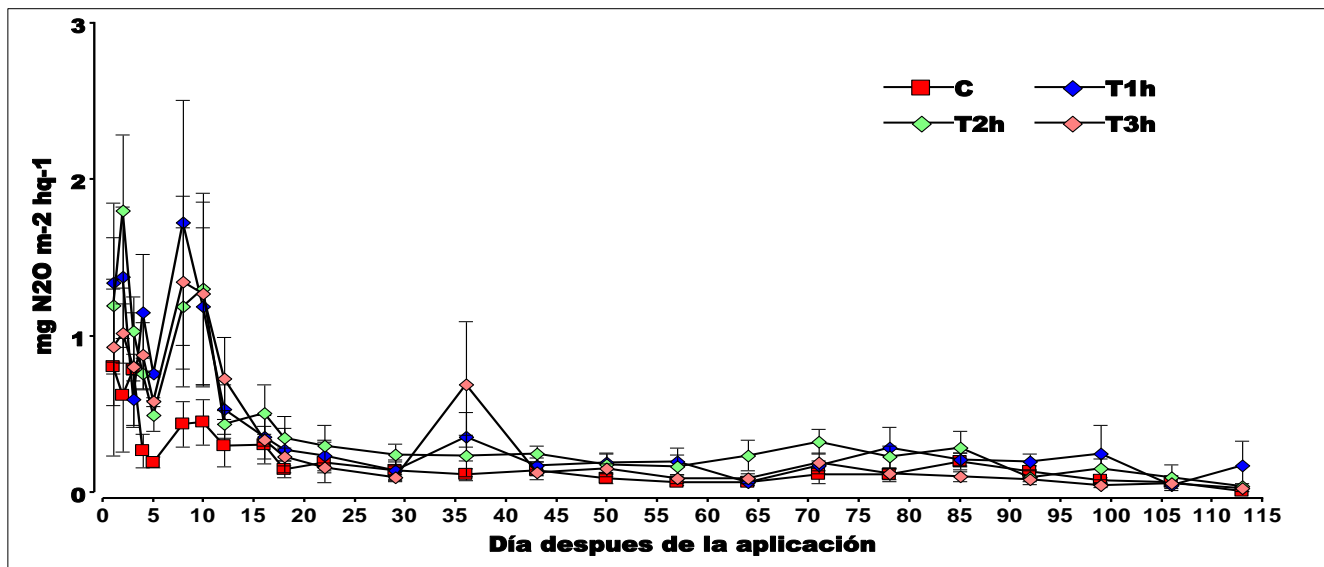


Figura 5. Flujos de óxido nitroso en parcelas tratadas con heces (T1h, T2h y T3h), comparados con los flujos del tratamiento control en un experimento realizado en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica

Durante los primeros 10 DDA los tratamientos, se encontró un comportamiento muy fluctuante de los parches de heces del grupo 2, con picos mayores a $2 \text{ mg N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ hr}^{-1}$ a los 7 DDA. Los altos picos en estos parches de heces se asocian en gran parte a la precipitación pluvial entre el día 1 DDA y el 3 DDA, lo que pudo marcar una elevada actividad en los flujos de óxido nitroso, comparado con los flujos del grupo 1 (Figura 6). Después de los 18 DDA los flujos se mantuvieron estables en el tiempo.

Si bien es cierto en el presente estudio los flujos de N_2O en los parches de heces son muy bajos comparados con los de orina, cuando vemos los picos altos en los primeros días (mayores a $2 \text{ mg N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ hr}^{-1}$), resultan más elevados que los reportados por otros estudios para parches de heces.

Cardoso *et al.* (2018) en su experimento bajo un clima tropical en Brasil reportaron picos de 0,8 mg N-N₂O m⁻² hr⁻¹ durante los primeros 10 días en parches de heces; Lessa *et al.* (2014) reportaron que en parches de heces tuvieron flujos de 0,316 mg N-N₂O m⁻² hr⁻¹ en su experimento establecido en Goias, Brasil. Luo *et al.* (2015), cuando aplicaron heces de oveja al suelo, registraron flujos máximos de 0,10 mg N-N₂O m⁻² hr⁻¹. En todos estos estudios se aplicaron tazas mucho más altas a las aplicadas en el presente estudio y, sin embargo, obtuvieron flujos menores. Esto se puede asociar a condiciones del sitio como temperatura, humedad relativa, precipitación y tipo de suelo, combinado con las características físicas de los parches de heces (Mazzeto *et al.* 2014), principalmente cuando existen cantidades considerables de N en forma mineral en las heces, el cual es fácilmente disponible para procesos de nitrificación y desnitrificación.

Por otro lado, después de los primeros 12 DDA no se encontró flujos mayores de N₂O para los parches de heces (Figura 7). Esto puede ser atribuido a la alta relación carbono-nitrógeno de las heces (hasta 19,62), lo que pudo reducir la disponibilidad del N aplicado (Tully *et al.* 2017). Además la cantidad de fenoles presentes en las heces (hasta 21,90 g kg A. Tánico⁻¹) Cuadro 2), pudo causar una depresión en los procesos microbiológicos de degradación del N (Powell *et al.* 1994; Snyder *et al.* 2010, Luo *et al.* 2015, Pelster *et al.* 2016). Fox *et al.* (1990) cuando evaluaron la tasa de degradación del N asociada al contenido de polifenoles de las plantas, concluyeron que la proporción N/lignina más polifenoles era un buen indicador de la tasa de mineralización.

La variabilidad de los datos no permitió estimar con certidumbre el acumulado a lo largo de los tres meses de duración del ensayo, si no que se realizó una estimación considerando solamente los primeros días después de la aplicación, en los cuales los muestreos fueron más frecuentes y donde se recolectó mayor información. En general, el acumulado para orina fue mucho más alto que el de heces, como se observa en las figuras 7 y 8. Esta diferencia entre el acumulado de kg N emitido entre la orina y las heces se puede asociar a la disponibilidad del N en la orina (Sordi *et al.* 2014; Pelster *et al.* 2016).

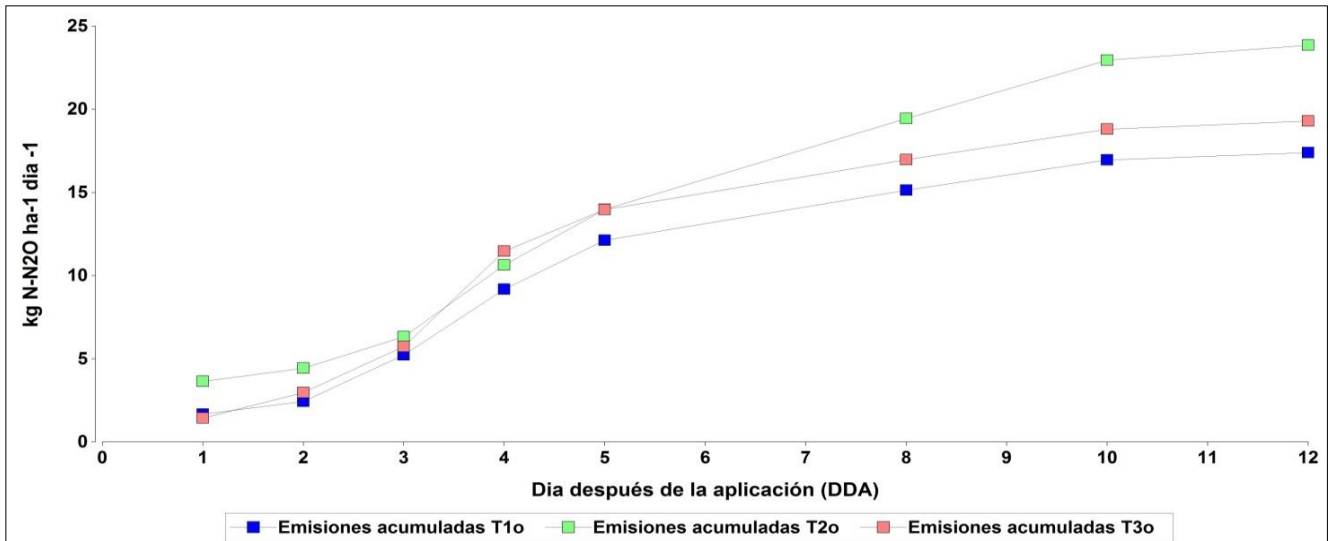


Figura 6. Curvas de las emisiones acumuladas para los tratamientos de orina en el experimento realizado para estimar los flujos de óxido nítrico en vacas alimentadas con *Tithonia diversifolia* en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Se observa que el acumulado en los tratamientos con orina no es relevante en los primeros 3 DDA el tratamiento, pero incrementa considerablemente entre el 3 y el 8 DDA (Figura 8). Esto indica que los flujos mayores fueron en este periodo, lo que concuerda con lo reportado para este tipo de estudios (Luo *et al.* 2015; Mazzetto *et al.* 2014; Cardoso *et al.* 2018; Tully *et al.* 2017).

El N en la orina se encuentra principalmente en forma de urea, la cual se considera altamente degradable. Sin embargo, esta debe ser hidrolizada por medio de la ureasa, lo que podría tomar alrededor de dos días antes de pasar a formas de N amoniacal (van Groegenin *et al.* 2015).

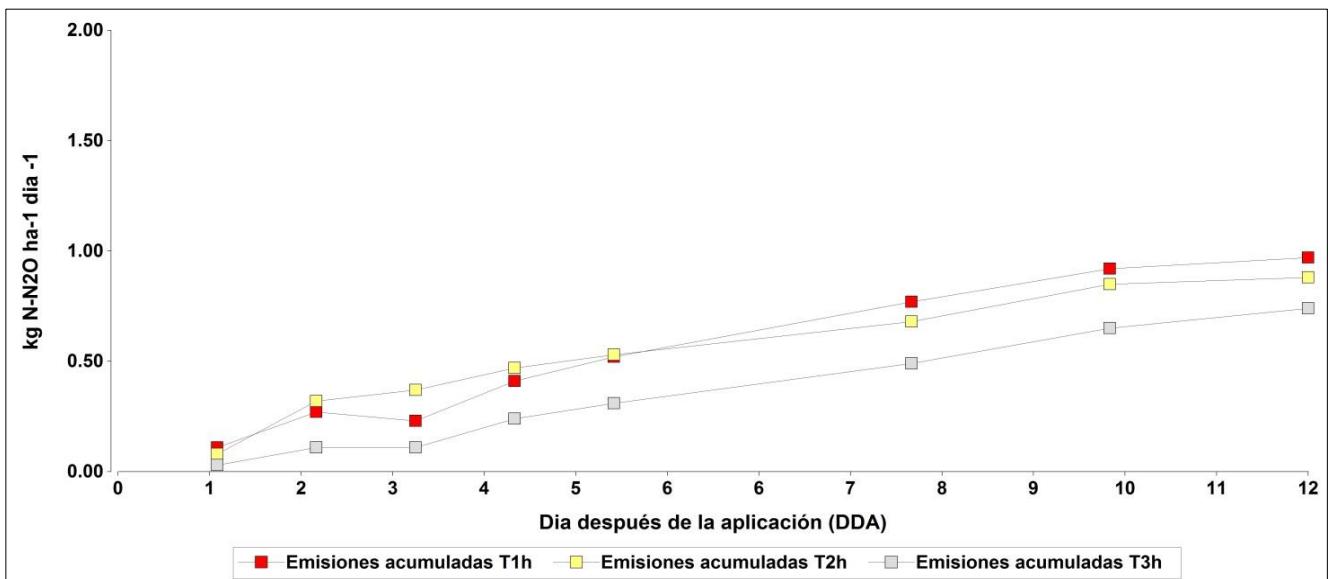


Figura 7. Curvas de las emisiones acumuladas para los tratamientos de heces en el experimento realizado para estimar los flujos de óxido nítrico en vacas alimentadas con *Tithonia diversifolia* en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Siguiendo la tendencia de los flujos, se encontraron diferencias entre los tratamientos de orina y heces; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) dentro de los tratamientos de heces (T1h, T2h, T3h) y orina (T1o, T2o, T3o), con medias de 0,85, 0,81, 0,67 kg N₂O ha⁻¹ (12 DDA) y de 15,65, 21,57 y 17,25 kg N₂O ha⁻¹ (12 DDA), respectivamente (Figura 8).

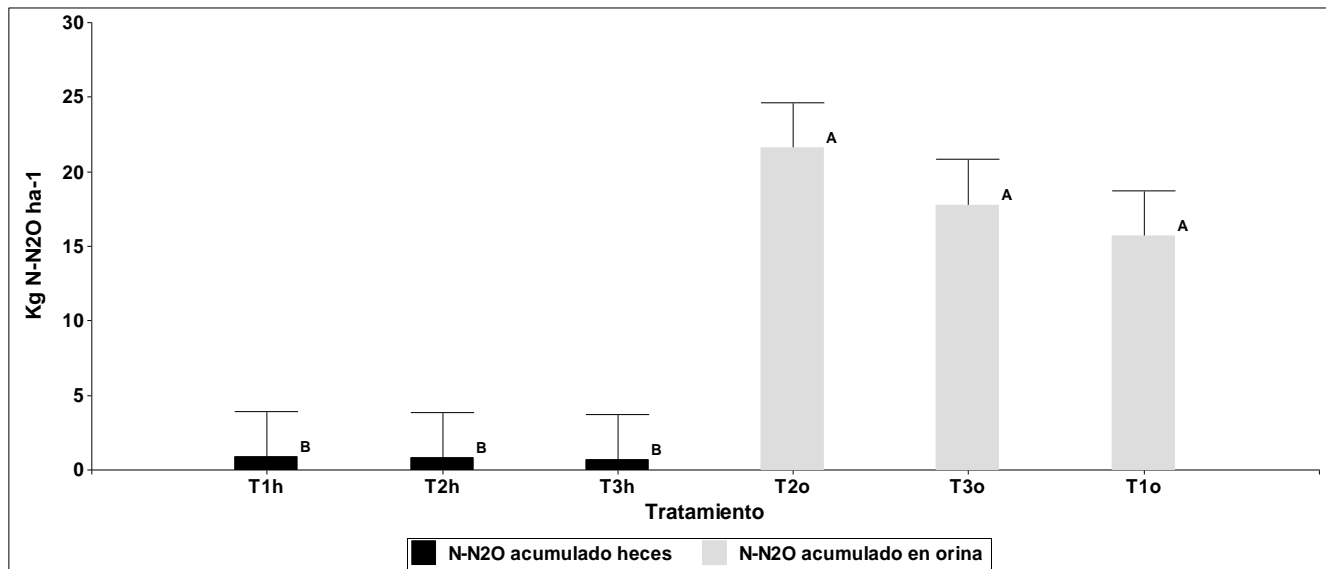


Figura 8. Flujos acumulados en los tratamientos con heces y orina durante 12 días después de la aplicación en el experimento realizado para estimar los flujos de óxido nitroso en vacas alimentadas con *Tithonia diversifolia* en la finca comercial del CATIE, Turrialba, Costa Rica

La media de N acumulado por los tratamientos de orina 12 DDA fueron muy elevados según lo que generalmente se ha reportado en estudios anteriores -factores de emisión más bajos que el 2% utilizado por IPCC para estas fuentes de N-, (Sordi *et al.* 2014; Mazzetto *et al.* 2015; Tully *et al.* 2017). Pelster *et al.* (2016) obtuvieron una media acumulada equivalente a 1 kg N-N₂O ha⁻¹ 28 días después de la aplicación de orina, igualmente Tully *et al.* (2017) reportan una media acumulativa de 2 kg N-N₂O ha⁻¹ en parches de orina y menos de 0,5 kg N-N₂O ha⁻¹ para heces, aunque este último resultado no se reporta claramente. Las condiciones del sitio como fuentes de variación pueden ser muchas, como las características de las excretas (Chantigny *et al.* 2013), calidad del forraje (Luo *et al.* 2015), características del suelo (Cardoso *et al.* 2017), o variables que pueden depender del manejo (Abalos *et al.* 2014). Los flujos acumulados del presente estudio se acercan al reportado por Cardoso *et al.* (2018) quienes encontraron una media de flujos acumulados mayor a 17 kg N-N₂O ha⁻¹ después de 14 días de la aplicación, donde la temperatura y las condiciones propias del área de estudio pudieron influir en las altas pérdidas de N.

Durante la etapa de recolección, la orina se almacenó en frío para conservar sus propiedades, sin embargo, no se utilizó preservantes que protegieran el N durante los dos días de almacenamiento, previo a la aplicación al suelo. Se sabe que una variable determinante en las emisiones de N₂O es la forma en la que el N llega al suelo. Independiente de ser una deposición de orina o heces, este podría encontrarse en forma de urea, NH₄ o NO₃, siendo esta última la forma más propensa a producir N₂O. Sin embargo, esta variable no siempre es determinante en los flujos de N₂O (Cardoso *et al.* 2017).

5.6 Conclusiones

- La pronunciada diferencia entre los picos de N_2O ($N-N_2O m^{-2} hr^{-1}$) en heces y orina responde a la teoría de que el uso de prácticas que reduzcan la cantidad de N excretado en la orina tiene un alto potencial para mitigar las emisiones de N_2O en sistemas ganaderos.
- Los tratamientos de orina de vacas alimentadas con *T. diversifolia* (T2o y T3o), no tuvieron efecto en los flujos de N_2O comparado con el tratamiento sin *T. diversifolia* (T1o). lo que impidió evidenciar el efecto de la cantidad de N aplicado en las emisiones de N_2O . Sin embargo, se reconoce que este efecto es muy difícil de evaluar con ensayos a campo abierto (Cardoso *et al.* 2018, Cardoso *et al.* 2017), principalmente cuando no existe una gran diferencia entre los tratamientos (T3o, T2o y T1o) con respecto a la cantidad de N aplicado (180, 213 y 237 $KgN^{-1}ha$ respectivamente). Lo anterior sí ha ocurrido en otros estudios donde la diferencia de N aplicado es mucho mayor (Luo *et al.* 2015).
- Los flujos de N_2O en las parcelas tratadas con heces son más bajos que los de orina, como se reporta en la literatura, lo que generalmente se atribuye a que el N en heces se encuentra en formas muy estables. Sin embargo, en este estudio se pudo observar que los flujos de N_2O en los parches de heces disminuyeron notablemente después de los primeros 5 días. De manera que la baja actividad registrada también podría asociarse a una pobre concentración de N en los parches de heces.
- Probablemente las emisiones de N_2O estuvieron parcialmente definidas por variables ambientales como temperatura, humedad y temperatura del suelo, las cuales pudieron confundir el efecto fuente y cantidad de N.

5.7 Recomendaciones

- El presente estudio no logró encontrar una diferencia de emisiones entre los tratamientos con mayor contenido de N y los de menor contenido. Sin embargo, se recomienda realizar más repeticiones en el tiempo para capturar la influencia de las diversas variables involucradas en los procesos de nitrificación y desnitrificación. Además, es importante llevar a cabo estudios que aumenten la diferencia de N entre los tratamientos de menor y mayor concentración, lo que podría generar una diferencia significativa en las emisiones, según se ha reportado en la literatura.
- Para próximos estudios es recomendable asegurar la disponibilidad de suficientes excretas que permitan simular adecuadamente las dimensiones de los parches de heces y orina. Lo anterior podría generar una mejor apreciación del efecto de los tratamientos, principalmente en pasturas donde las emisiones de N₂O son constantes.

5.8 Bibliografía

- Abalos, D; Jeffery, S; Sanz-Cobena, A; Guardia, G; Vallejo, A. 2014. Metaanalysis of the effect of urease and nitrification inhibitors on crop productivity and nitrogen use efficiency. *Agr. Ecosyst. Environ* 189:136-144.
- Aguirre A. 1971. Estudio de los suelos del área del Centro Tropical de Investigación y Enseñanza, IICA-Turrialba, C.R. Thesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, IICA. 138 p.
- Annisson, EF; Bryden, WL. 1999. Perspectives on ruminant nutrition and metabolism. II. Metabolism in ruminant tissues. *Nutr Res Rev* 12(1):147-177.
- Barneze, AS; Mazzetto, AM; Zani, CF; Misselbrook, T; Cerri, CC. 2014. Nitrous oxide emissions from soil due to urine deposition by grazing cattle in Brazil. *Atmospheric Environment* 92:394-397.
- Bertram, J; Clough, T; Condon, L; Sherlock, R; O'Callaghan, M. 2010. Hippuric acid effect on N₂O emissions from cow urine patches at a range of soil temperatures. (19th, 2010, Brisbane, Australia). World Congress of Soil Science. Soil Solutions for a Changing World. Brisbane, Australia. Published on DVD.
- Bertram, JE; Clough, TJ; Sherlock, RR; Condon, LM; O'Callaghan, M; Wells, NS; Ray, JL. 2009. Hippuric acid and benzoic acid inhibition of urine derived N₂O emissions from soil. *Global Change Biology* 15(8):2067-2077.
- Byrnes, RC; Nuñez, J; Arenas, L; Rao, I; Trujillo, C. 2017. Biological nitrification inhibition by Brachiaria grasses mitigates soil nitrous oxide emissions from bovine urine patches. *Soil Biology & Biochemistry* 107:-156-163.
- Cardoso A, Quintanaa B, Rosseto-Janusckiewicz E, de Figueiredo L, E da Silva, Andrade, R; Ruggieria, AC. 2017. N₂O emissions from urine-treated tropical soil: Effects of soil moisture and compaction, urine composition, and dung addition. *Catena* 157:325-332.
- Cardoso, A; Alves, BJR; Urquiaga, S; Boddey, RM. 2018. Effect of volume of urine and mass of faeces on N₂O and CH₄ emissions of dairy-cow excreta in a tropical pasture. *Animal Production Science* 58(6):-1079-1086.
- CEPAL (Comisión Económica para América Latina y el Caribe); FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación); IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). 2015. *Perspectivas de la agricultura y del desarrollo rural en las Américas: una mirada hacia América Latina y el Caribe 2015-2016*. San José, Costa Rica. 214 p. Consultado 13 ago. 2018. Disponible en <http://repositorio.iica.int/bitstream/11324/2552/1/BVE17038649e.pdf>
- Chacón, A; Jiménez, V; Montenegro, B; Sasa, M; Blanco, S. 2014. Inventario nacional de gases de efecto invernadero y absorción de carbono. San José, Costa Rica, MINAE(IMN).

- Chantigny, MH; Pelster, DE; Perron, M-H; Rochette, P; Angers, DA; Parent, LÉ; Massé, D; Ziadi, N. 2013. Nitrous oxide emissions from clayey soils amended with paper sludges and biosolids of separated pig slurry. *J. Environ. Qual* 42(1):30-39.
- Clough, TJ; Ray, JL; Buckthought, LE; Calder, J; Baird, D; O'Callaghan, M; Sherlock, R; Condon, LM. 2009. The mitigation potential of hippuric acid on N₂O emissions from urine patches: An *in situ* determination of its effect. *Soil Biology & Biochemistry* 41(10):2222–2229.
- Compton, JE; Harrison, JA; Dennis, RL; Greaver, TL; Hill, BH; Jordan, SJ; Walker, H; Campbell, HV. 2011. Ecosystem services altered by human changes in the nitrogen cycle: a new perspective for US decision making. *Ecology Letters* 14(8):804–815.
- De Klein, CAM; Harvey, M; Alfaro, MA; Chadwick, DR; Clough, TJ; Grace, P; Kelliher, FM; Rochette, P; Venterea, RT. 2015. Nitrous oxide chamber methodology guidelines version 1.1. Wellington. 146 p.
- Fox, RH; Myers, RJK; Vallis, I. 1990. The nitrogen mineralization rate of legume residues as influenced by their polyphenol, lignin and nitrogen contents. *Plant and Soil* 129(2):251-259.
- Gallego, C; Mahecha, L; Angulo, A. 2017. Producción, calidad de leche y beneficio: costo de suplementar vacas holstein con *Tithonia diversifolia*. *Agron. Mesoam* 28(2):357-370
- Galbally, IE; Meyer, CP; Wang, YP; Kirstine, WV. 2010. Soil-atmosphere exchange of CH₄, CO, N₂O and NO_x and the effects of land-use change in the semiarid Mallee system in Southeastern Australia. *Global Change Biology* 16(9):2407-2419.
- Hess, HD; Tiemann, TT; Stürm, ChD; Carulla JE; Lascano, CE; Kreuzer, M. 2006. Effects of tannins on ruminal degradation and excretory pattern of N and implications for the potential N emission from the manure. *International Congress Series* 1293: 339-342.
- Hoben, JB; Gehl, RJ; Millar N; Grace, PR; Robertson, GP. 2011. Nonlinear nitrous oxide (N₂O) response to nitrogen fertilizer in on-farm corn crops of the US. *Global Change Biology* 17(2): 1140-1152.
- Holdridge, L. 1978. Ecology based on life zones. Instituto Interamericano de Ciencias Americanas. San Jose, Costa Rica. 206 pp.
- Hristov, AN; Oh, J; Lee, C; Meinen, R; Montes, F; Ott, T; Firkins, J; Rotz, A; Dell, C; Adesogan, A; Yang, W; Tricarico, J; Kebreab, E; Waghorn, G; Dijkstra, J; Oosting, S. 2013. Mitigación de las emisiones de gases de efecto invernadero en la producción ganadera - Una revisión de las opciones técnicas para la reducción de las emisiones de gases diferentes al CO₂. Gerber, PJ; Henderson, B; y Makkar, HPS (eds.). Roma, Italia, FAO. 231 p. (Producción y Sanidad Animal FAO Documento No. 177).
- Hutchinson, GL; Mosier, AR. 1981. Improved soil cover method for field measurement of nitrous-oxide fluxes. *Soil Science Society of America Journal* 45(2):311–316.

- Hyde, BP; Hawkins, MJ; Fanning, AF; Noonan, D; Ryan, M; O`Toole, P; Carton, OT. 2006. Nitrous oxide emissions from a fertilized and grazed grassland in the South East of Ireland. *Nutr Cycl Agroecosyst* 75(1-3):187-200.
- Külling, DR; Menzi, H; Krober, TF; Neftel, A; Sutter, F; Lischer, P; Kreuzer, M. 2001. Emissions of ammonia, nitrous oxide and methane from different types of dairy manure during storage as affected by dietary protein content, *J. Agric. Sci. Camb.* 137:235-250.
- Lessaa, AC; Madarib, BE; Paredesa, DS; Boddey, RM; Urquiagac, S; Jantaliac, CP; Alvesc, BJ. 2014. Bovine urine and dung deposited on Brazilian savannah pastures contribute differently to direct and indirect soil nitrousoxide emissions. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 190:-104-111.
- Lezcano, Y; Soca, M; Ojeda, F; Roque, E; Fontes, D; Montejo, IL; Santana H; Martínez, J; Cubillas, N. 2012. Caracterización bromatológica de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray en dos etapas de su ciclo fisiológico. *Pastos y Forrajes* 35(3):275-282.
- Luo, J; de Klein, CAM; Ledgard, SF; Saggar, S. 2010. Management options to reduce nitrous oxide emissions from intensively grazed pastures: a review. *Agriculture Ecosystems & Environment* 136(3-4):282-291.
- Luo, J; Lindsey, SB; Ledgard, SF. 2008. Nitrous oxide emissions from animal urine application on a New Zealand pasture. *Biology and Fertility of Soils* 44(3):463-470.
- Luo, J; Sun, XZ; Pacheco, D; Ledgard, SF; Lindsey, SB; Hoogendoorn, CJ; Wise, B; Watkins, NL; 2015. Nitrous oxide emission factors for urine and dung from sheep fed either fresh forage rape (*Brassica napus*) L. or fresh perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Animal - An International Journal of Animal Bioscience* 9(3): 534-543.
- Makkar, HPS. 2003. Quantification of tannins in tree and shrub foliage. A laboratory manual. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. 102 p.
- Mazzetto, AM; Barneze, AS; Feigl, BJ; Van Groenigen, JW; Oenema, O; De Klein, CAM. 2015. Use of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) does not mitigate N₂O emission from bovine urine patches under Oxisol in Northwest Brazil. *Nutr. Cycling Agroecosyst* 101(1):83-92.
- Mazzetto, AM; Barneze, AS; Feigl, BJ; Van Groenigen, JW; Oenema, O; Cerri, CC. 2014. Temperature and moisture affect methane and nitrous oxide emission from bovine manure patches in tropical conditions. *Soil Biol. Biochem.* 76:242-248.
- McSweeney, CS; Palmer, B; McNeill, DM; Krause, DO. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 91(1-2):83-93.
- Medina, M; García D; González, E; Cova L; Morantinos, P.2009. Variables morfo-estructurales y de calidad de la biomasa de *Tithonia diversifolia* en la etapa inicial de crecimiento. *Zootecnia Trop.* 27(2):121- 134.

- Oenema, O; Velthof, GL; Yarnulki, S; Jarvia, SC. 1997. Nitrous oxide emissions from grazed grassland. *Soil Use and Management* 13(s4):288-295.
- Pelster, DE; Gisore, B; Koske, JK; Goopy, J; Korir, D; Rufino MC; Butterbach-Bahl, K. 2016. Methane and Nitrous Oxide Emissions from Cattle Excreta on an East African Grassland. *J. Environ. Qual.* 45(5):1531-1539.
- Powell, JM; Fernández-Rivera, S; Hofs, S. 1994. Effects of sheep diet on nutrient cycling in mixed farming systems of semi-arid West Africa. *Agric. Ecosyst. Environ.* 48(3):263-271.
- Powell, JM; Wattiaux, MA; Broderick, GA. 2011. Short communication: Evaluation of milk urea nitrogen as a management tool to reduce ammonia emissions from dairy farms. *J. Dairy Sci.* 94(6):4690-4694.
- Reynolds, CK. 1992. Metabolism of nitrogen compounds by ruminal liver. *J Nutr* 122(3 Suppl):850-854.
- Saggar, S; Andrew, R; Tate, K; Hedley, C; Rodda, N; Townsend, A. 2004. Modelling nitrous oxide emissions from New Zealand dairy grazed pastures. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 68(3): 243-255.
- SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). 2014. Boletín Estadístico Agropecuario Nº28 |Serie Cronológica 2014 – 2017. Visto en: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/BEA-0028.PDF>
- Schils, RLM; Eriksen, J; Ledgard, SF. Vellinga, TV; Kuikman, PJ; Luo, J; Petersen, SO; Velthof, GL. 2013. Strategies to mitigate nitrous oxide emissions from herbivore production systems. *Animal* 7(Suppl 1):29-40.
- Smith, KA; Ball, T; Conen, F; Dobbie, KE; Massheder, J; Rey, A. 2003. Exchange of greenhouse gases between soil and atmosphere: interactions of soil physical factors and biological processes. *Eur. J. Soil Sci.* 54(4):779-791.
- Snyder, AJ; Johnson-Maynard, JL; Morra, MJ. 2010. Nitrogen mineralization in soil incubated with ¹⁵N-labeled brassicaceae seed meals. *Applied Soil Ecology* 46(1):73-80.
- Sordi, A; Dieckow, J; Bayer, C; Albuquerque, MA; Piva, JT; Zanatta, JA; Tomazie, M; Machado, C; de Moraes, A. 2014. Nitrous oxide emission factors for urine and dung patches in a subtropical Brazilian pastureland. *Agric. Ecosyst. Environ* 190:94-103.
- Tully, KL; Abwanda, S; Thiong'o, M; Mutuo, PM; Rosenstock, TS. 2017. Nitrous Oxide and Methane Fluxes from Urine and Dung Deposited on Kenyan Pastures. *J. Environ. Qual.* 46(4):921-929.
- van Groenigen, JW; Huygens, D; Boeckx, P; Kuyper, ThW; Lubbers, IM; Rütting, T; Groffman, PM. 2015. The soil N cycle: new insights and key challenges. *Soil* 1:-235-256.

- van Groenigen, JW; Kuikman PJ; de Groot, WJM; Velthof, GL. 2005a. Nitrous oxide emissions from urine treated soil as influenced by urine composition and soil physical conditions. *Soil Biology & Biochemistry* 37(3):463-473.
- van Groenigen, JW; Velthof, GL; van der Bolt, FJE; Vos, A; Kuikman, PJ. 2005b. Seasonal variation in N₂O emissions from urine patches: effects of urine concentration, soil compaction and dung. *Plant and Soil* 273(1-2):15-27.

6. Anexos

Anexo 1. Formato para toma de datos de campo en experimento de dietas suplementadas con *Tithonia diversifolia*

Tabla de alimentación diaria													
Fecha:			Hora:				Responsable:						
Vaca número		Trat.	kg/tratamiento								Consumo (kg)		Leche (kg)
Exp	Finca		Thithonia	Concentr.	Pasto_corte	Citropulpa	Soya	Mineral	Melaza	Sal	O	R	
1	606	T()											
2	654	T()											
3	637	T()											
4	280	T()											
5	526	T()											
6	750	T()											
7	663	T()											
8	592	T()											
9	523	T()											

Anexo 2. Formato de campo para toma de datos en muestro de oxido nitroso

Fecha: _____ Responsable: _____ Hora inicial: _____ Hora final: _____

Cám	T0						T20						T40					
	ID	Hora	Temp		% hum amb	% hum suelo	ID	Hora	Temp		% hum amb	% hum suelo	ID	Hora	Temp		% hum amb	% hum suelo
			Int.	Ext.					Int.	Ext.					Int.	Ext.		
C1	925					926						927						
C2	928					929						930						
C3	931					932						933						
C4	934					935						936						
C5	937					938						939						
C6	940					941						942						
C7	943					944						945						
C8	946					947						948						
C9	949					950						951						
C10	952					953						954						
C11	955					956						957						
C12	958					959						960						
C13	961					962						963						
C14	964					965						966						
Amb	967											968						